

Affinity peptides

Patent Number: ☐ US5284933

Publication date: 1994-02-08

Inventor(s): EGGIMANN BERNHARD (CH); DOEBELI HEINZ (CH); HOCHULI ERICH (CH); GENTZ REINER (DE); STUEBER DIETRICH (DE)

Applicant(s): HOFFMANN LA ROCHE (US)

Requested Patent: ☐ EP0282042, A3, B1

Application Number: US19880158962 19880222

Priority Number (s): CH19870000895 19870310

IPC Classification: C07K13/00

EC Classification: C12N15/62, C07K14/57, C12N15/70

Equivalents: AU1270988, AU609783, DE3889949D, ☐ DK173951B, DK84288, IE63991, JP2686090B2, ☐ JP63251095, NZ223735, ZA8801534

Abstract

Fusion proteins and a process for their purification by means of metal chelate affinity chromatography on NTA resins are provided by this invention.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 282 042 B1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag der Patentschrift: **08.06.94**

(21) Anmeldenummer: **88103740.2**

(22) Anmeldetag: **09.03.88**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 13/00, C07K 3/18,
C12P 21/02, C12N 15/00,
C07K 15/26, C12N 9/02,
C12P 21/06, A61K 37/02**

(54) **Neue Fusionsproteine und deren Reinigung.**

(30) Priorität: **10.03.87 CH 895/87**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
14.09.88 Patentblatt 88/37

(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
08.06.94 Patentblatt 94/23

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(56) Entgegenhaltungen:
**EP-A- 0 184 355
EP-A- 0 253 303
US-A- 4 569 794**

**TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Band 3, Nr. 1,
Januar 1985, Seiten 1-7, Elsevier Science
Publishers B.V., Amsterdam, NL; E. SUL-
KOWSKI: "Purification of proteins by IMAC"**

(73) Patentinhaber: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Postfach 3255
CH-4002 Basel(CH)**

(72) Erfinder: **Döbell, Heinz, Dr.
Lupsingerstrasse 22
CH-4417 Ziefen(CH)
Erfinder: Eggimann, Bernhard, Dr.
Eulerstrasse 83
CH-4051 Basel(CH)
Erfinder: Gentz, Reiner, Dr.
Am Hochgericht 34
D-7888 Rheinfelden(DE)
Erfinder: Hochuli, Erich, Dr.
Kirchackerstrasse 25
CH-4411 Arisdorf(CH)
Erfinder: Stüber, Dietrich, Dr.
Bandweg 9
D-7889 Grenzach-Wyhlen(DE)**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 0 282 042 B1

BIOCHEMISTRY, Band 22, 1983, Seiten 1621-1630, American Chemical Society, Washington, DC, US; J. PORATH et al.: "Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions"

BIOTECHNOLOGY, Band 6, Nr. 11, November 1988, Seiten 1321-1325; E. HOCHULI et al.: "Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent"

Biologically Active Molecules, E. Hochuli, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1989, pp. 217-239

Journal of Chromatography, 516, 333-354, 1990, M. Belew et al.

⑦ Vertreter: Lederer, Franz, Dr. et al
Lederer, Keller & Riederer
Patentanwälte
Prinzregentenstrasse 16
D-80538 München (DE)

Beschreibung

Die Möglichkeiten der Gentechnologie, Hybridgene herzustellen, eröffnen neue Wege zur Aufarbeitung von rekombinanten Proteinen. Durch Verknüpfung der kodierenden Gensequenz eines gewünschten Proteins mit der kodierenden Gensequenz eines Proteinfragments mit hoher Affinität für einen Liganden (Affinitätspeptid) ist es möglich, gewünschte rekombinante Proteine in Form von Fusionsproteinen in einem Schritt unter Ausnutzung des Affinitätspeptids zu reinigen. Durch gezielte Mutagenese ("site-directed mutagenesis") ist es ferner möglich, spezifische chemische oder enzymatische Schnittstellen am Verknüpfungspunkt von Affinitätspeptid und gewünschtem rekombinanten Protein einzuführen, so dass nach der Reinigung des Fusionsproteins mittels eines geeigneten Affinitätsharzes das gewünschte rekombinante Protein durch chemische oder enzymatische Spaltung erhältlich ist. Derartige Feinreinigungsmethoden sind beispielsweise bekannt aus Science 198, 1056-1063 (1977) (Itakura et al.), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 6848-6852 (1983) (Germino et al.), Nucleic Acids Res. 13, 1151-1162 (1985) (Nilsson et al.), Gene 32, 321-327 (1984) (Smith et al.), sowie aus den europäischen Patentanmeldungen, Publikations-Nummern 150126 und 184 355.

Die Europäische Patentanmeldung, Publikations-Nummer 184 355, offenbart ein Verfahren zur Reinigung von Fusionsproteinen, die aus einem Affinitätspeptid, welches mindestens einen Histidinrest aufweist, und einem biologisch aktiven Protein bestehen. Verschiedene Beispiele für bevorzugte Affinitätspeptide werden offenbart, die u.a. die Peptidsequenz His-Gly-His mitumfassen. Als Harze für die Reinigung der Fusionsproteine werden Chelatharze genannt, insbesondere Chelatharze mit Iminodiessigsäure (IDA) als komplexbildender Komponente.

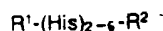
Die Reinigung von Proteinen mit nicht-benachbarten Histidinresten mittels Chelatharzen mit IDA als komplexbildender Komponente wird auch in Trends in Biotechnology 3, 1-7 (1985) (Sulkowski) beschrieben.

Affinitätspeptide mit möglichst grosser Affinität zu Metallchelatharzen, die die problemlose Reinigung von nativen und denaturierten Proteinen ermöglichen, sind aus keiner der vorstehend genannten Publikationen bekannt.

Erfindungsgemäss wurde nun gefunden, dass Affinitätspeptide mit mindestens zwei benachbarten Histidinresten für die Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels Metallchelat-Affinitäts-Chromatographie an Nitrilotriessigsäure (NTA)-Harzen besonders geeignet sind. Diese Affinitätspeptide zeichnen sich gegenüber den bekannten vor allem dadurch aus, dass sie die problemlose Reinigung von nativen und denaturierten Proteinen mittels NTA-Harzen ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher Fusionsproteine, die aus einem oder zwei Affinitätspeptiden, welche benachbarte Histidinreste enthalten, und einem an diese Affinitätspeptide direkt oder indirekt gebundenen biologisch aktiven Polypeptid oder Protein bestehen, Verfahren zu deren Herstellung mittels rekombinanter DNA-Technologie sowie Verfahren zu deren Reinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie an NTA-Harzen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Gene, die für diese Fusionsproteine kodieren, Expressionsvektoren, die diese Gene enthalten, mit diesen Expressionsvektoren transformierte Mikroorganismen sowie Verfahren zur Herstellung solcher Gene, Expressionsvektoren und transformierter Mikroorganismen.

Die Affinitätspeptide der erfindungsgemässen Fusionsproteine sind durch die allgemeinen Formel



definiert,

worin R^1 Wasserstoff, eine Aminosäure oder eine Sequenz von mehreren Aminosäuren ist, R^2 Q, Q-Ile-Glu-Gly-Arg- oder Q-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- darstellt und Q eine Peptidbindung, eine Aminosäure oder eine Sequenz von mehreren, max. 30 Aminosäuren ist.

Besonders bevorzugte Affinitätspeptide der erfindungsgemässen Fusionsproteine sind solche mit den Peptidsequenzen der Formeln

Met-His-His,

Met-His-His-His,

Met-His-His-His-His,

Met-His-His-His-His-His,

Met-His-His-His-His-His-His,

Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg

und Met-His-His-Ala-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys.

Die Affinitätspeptide der erfindungsgemässen Fusionsproteine können direkt oder indirekt an die biologisch aktiven Polypeptide oder Proteine gebunden sein. Bei der Verwendung eines einzelnen Affinitätspeptids kann dieses entweder an die aminoterminalen oder an die carboxyterminalen Aminosäure der biologisch aktiven Polypeptide oder Proteine gebunden sein. Bei der Verwendung von zwei Affinitätspeptiden wird das eine an die aminoterminalen und das andere an die carboxyterminalen Aminosäure der biologisch aktiven Polypeptide oder Proteine gebunden.

Bei indirekter Bindung enthalten die Affinitätspeptide eine geeignete, selektive Schnittstelle über die sie an das gewünschte biologisch aktive Polypeptid oder Protein gebunden sind. Als geeignete, selektive Schnittstellen kommen vorzugsweise die Aminosäuresequenzen $-(\text{Asp})_n\text{-Lys-}$, worin n 2, 3 oder 4 bedeutet, oder $-\text{Ile-Glu-Gly-Arg-}$ in Frage, die von den Proteasen Enterokinase bzw. Koagulations-Faktor X_a spezifisch erkannt werden. Solche Affinitätspeptide werden dann in an sich bekannter Weise enzymatisch abgespalten.

Bei direkter Bindung bleiben die Affinitätspeptide mit dem gewünschten biologisch aktiven Polypeptid oder Protein verbunden, d.h. die Affinitätspeptide können nicht chemisch oder enzymatisch abgespalten werden. Diese Art der Bindung ist dann vorteilhaft, wenn durch die Anwesenheit des Affinitätspeptids die Aktivität des gewünschten Polypeptids oder Proteins nicht nachteilig beeinflusst wird. Solche erfindungsgemässen Fusionsproteine können für eine Anzahl von immunologischen Verfahren verwendet werden. Sie können beispielsweise als Reagenzien zur Bestimmung von Infektionskrankheiten verwendet werden. Indem man sie einem physiologisch verträglichen Trägermaterial beimischt, können sie auch als Impfstoffe zur Verhütung von Krankheiten verwendet werden.

Der Ausdruck "biologisch aktive Polypeptide oder Proteine" der im Zusammenhang mit den erfindungsgemässen Fusionsproteinen verwendet wird, bezieht sich auf solche Polypeptide oder Proteine, die selbst biologisch aktiv sind oder aber auf Polypeptide oder Proteine, die für die Herstellung von biologisch aktiven Polypeptiden oder Proteinen verwendet werden können.

Als biologisch aktive Polypeptide oder Proteine kommen beispielsweise Malaria-Oberflächenantigene, insbesondere das 5.1-Oberflächenantigen, das CS-Protein und das p190-Protein von Plasmodium falciparum, Lymphokine, Interferone, Insulin und Insulin-Vorläufer, HIV-1 und HIV-2 Hüll- und Strukturproteine, Wachstumshormone und Wachstumshormon-Releasing-Faktoren in Frage. Besonders bevorzugte biologisch aktive Polypeptide oder Proteine der erfindungsgemässen Fusionsproteine sind solche mit der Aminosäuresequenz von Human-Immun-Interferon und Teilsequenzen von Human-Immun-Interferon, insbesondere solche mit den Aminosäuresequenzen der Formeln:

Gln-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr-Phe-
 Asn-Ala-Gly-His-Ser-Asp-Val-Ala-Asp-Asn-Gly-Thr-Leu-Phe-Leu-
 5 Gly-Ile-Leu-Lys-Asn-Trp-Lys-Glu-Glu-Ser-Asp-Arg-Lys-Ile-Met-
 Gln-Ser-Gln-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Asn-Phe-
 Lys-Asp-Asp-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Ser-Val-Glu-Thr-Ile-Lys-Glu-
 Asp-Met-Asn-Val-Lys-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Asp-
 10 Asp-Phe-Glu-Lys-Leu-Thr-Asn-Tyr-Ser-Val-Thr-Asp-Leu-Asn-Val-
 Gln-Arg-Lys-Ala-Ile-His-Glu-Leu-Ile-Gln-Val-Met-Ala-Glu-Leu-
 Ser-Pro-Ala-Ala-Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-
 15 Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln.

Gln-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr-Phe-
 20 Asn-Ala-Gly-His-Ser-Asp-Val-Ala-Asp-Asn-Gly-Thr-Leu-Phe-Leu-
 Gly-Ile-Leu-Lys-Asn-Trp-Lys-Glu-Glu-Ser-Asp-Arg-Lys-Ile-Met-
 Gln-Ser-Gln-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Asn-Phe-
 Lys-Asp-Asp-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Ser-Val-Glu-Thr-Ile-Lys-Glu-
 25 Asp-Met-Asn-Val-Lys-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Asp-
 Asp-Phe-Glu-Lys-Leu-Thr-Asn-Tyr-Ser-Val-Thr-Asp-Leu-Asn-Val-
 Gln-Arg-Lys-Ala-Ile-His-Glu-Leu-Ile-Gln-Val-Met-Ala-Glu-Leu-
 30 Ser-Pro-Ala-Ala-Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu
 und

Gln-Asn-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr-Phe-
 35 Asn-Ala-Gly-His-Ser-Asp-Val-Ala-Asp-Asn-Gly-Thr-Leu-Phe-Leu-
 Gly-Ile-Leu-Lys-Asn-Trp-Lys-Glu-Glu-Ser-Asp-Arg-Lys-Ile-Met-
 Gln-Ser-Gln-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Asn-Phe-
 40 Lys-Asp-Asp-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Ser-Val-Glu-Thr-Ile-Lys-Glu-
 Asp-Met-Asn-Val-Lys-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Asp-
 Asp-Phe-Glu-Lys-Leu-Thr-Asn-Tyr-Ser-Val-Thr-Asp-Leu-Asn-Val-
 Gln-Arg-Lys-Ala-Ile-His-Glu-Leu-Ile-Gln-Val-Met-Ala-Glu-Leu-
 45 Ser-Pro-Ala-Ala-Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu

sowie solche mit der Aminosäuresequenz der Dihydrofolatreduktase der Maus.

50 Die Herstellung der erfindungsgemässen Fusionsproteine kann nach bekannten, in der Literatur beschriebenen Methoden der rekombinanten DNA Technologie erfolgen. Vorzugsweise werden zunächst die für die gewünschten Affinitätspeptide kodierenden Nukleotidsequenzen synthetisiert und diese dann mit einer für das gewünschte biologisch aktive Polypeptid oder Protein kodierenden Nukleotidsequenz verknüpft.

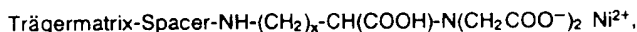
55 Der Einbau des so erhaltenen Hybridgens in Expressionsvektoren, beispielsweise die Plasmide pDS8/RBSII,SphI; pDS5/RBSII,3A+5A; pDS78/RBSII oder pDS56/RBSII und andere handelsübliche bzw. allgemein zugängliche Plasmide erfolgt ebenfalls in an sich bekannter Weise. Hierzu kann auf das Lehrbuch von Maniatis et al. ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) verwiesen werden.

Die Methoden zur Expression der erfindungsgemässen Fusionsproteine sind ebenfalls an sich bekannt und in dem vorstehend genannten Lehrbuch eingehend beschrieben. Sie umfassen die folgenden Massnahmen:

- (a) Transformation eines geeigneten Wirtsorganismus, vorteilhaft *E. coli*, mit einem Expressionsvektor in welchem ein vorstehend genanntes Hybridgen operativ an eine Expressionskontrollsequenz gebunden ist;
- (b) Kultivierung des so erhaltenen Wirtsorganismus unter geeigneten Wachstumsbedingungen; und
- (c) Extraktion und Isolierung des gewünschten Fusionsproteins aus dem Wirtsorganismus.

Als Wirtsorganismen kommen gram-negative und gram-positive Bakterien in Frage, beispielsweise *E. coli* und *B. subtilis* Stämme. Ein besonders bevorzugter Wirtsorganismus der vorliegenden Erfindung ist der *E. coli* Stamm M15 (s. S.17). Ausser dem oben genannten *E. coli* Stamm können aber auch andere allgemein zugängliche *E. coli* Stämme, beispielsweise *E. coli* 294 (ATCC No. 3144), *E. coli* RR1 (ATCC No. 31343) und *E. coli* W3110 (ATCC No. 27325) verwendet werden.

Ideale Metallchelatharze für die Reinigung der erfindungsgemässen Fusionsproteine sind Nitrilotriessigsäure-(NTA)-Harze der allgemeinen Formel

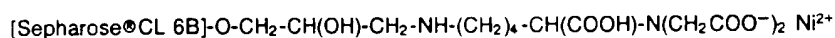


worin x 2, 3 oder 4 bedeutet.

Als Trägermatrix kommen Materialien in Frage, wie sie in der Affinitäts- und Gelchromatographie verwendet werden, beispielsweise vernetzte Dextrane, Agarose (insbesondere in der unter dem Warenzeichen Sepharose® bekannten Form) oder Polyacrylamide.

Als Spacer kommen die aus der Affinitäts-Chromatographie bereits bekannten Spacer-Gruppen in Frage, wobei die Gruppen -O-CH₂-CH(OH)-CH₂- und -O-CO- bevorzugt sind.

Ein besonders bevorzugtes NTA-Harz für die Reinigung der erfindungsgemässen Hybridproteine ist das der Formel



dessen Herstellung wie in Beispiel 10 beschrieben erfolgen kann.

Für die Reinigung der erfindungsgemässen Fusionsproteine können die vorstehend genannten NTA-Harze batch-weise oder in kontinuierlich zu betreibenden Säulen verwendet werden. Die NTA-Harze werden vor der Beladung mit erfindungsgemässigem Fusionsprotein zweckmässigerweise mit einem wässrigen Puffer, der selber keine Chelate mit Nickel bildet, vorzugsweise einem Tris-HCl Puffer, pH 7,5, äquilibriert. Der Äquilibrierungspuffer (wie auch die Elutionspuffer) kann ein Denaturierungsmittel bzw. ein Detergenz, beispielsweise Guanidin-HCl, Harnstoff oder Triton enthalten. Der Zusatz eines solchen Denaturierungsmittels oder Detergenzes ermöglicht problemloses Arbeiten selbst mit erfindungsgemässen Fusionsproteinen, die in wässriger Lösung extrem schwer löslich sind. Die Elution der erfindungsgemässen Fusionsproteine kann bei konstantem pH-Wert oder mit linear oder diskontinuierlich fallenden pH-Gradienten durchgeführt werden. Die optimalen Elutionsbedingungen hängen von der Menge und Art der vorhandenen Verunreinigungen, der Menge des zu reinigenden Materials, den Säulendimensionen usw. ab und sind zweckmässigerweise von Fall zu Fall zu bestimmen.

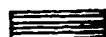
Die folgenden Beispiele illustrieren die Herstellung erfindungsgemässer Fusionsproteine, deren Reinigung mittels Metallchelatchromatographie sowie die Herstellung von biologisch aktiven Polypeptiden oder Proteinen durch enzymatische Spaltung der gereinigten, erfindungsgemässen Fusionsproteine.

Diese Beispiele können besser verstanden werden, wenn sie im Zusammenhang mit den begleitenden Abbildungen gelesen werden. In diesen Abbildungen treten die folgenden Abkürzungen und Symbole auf:

B, Bg, E, H, N, Na, Nd, P, S, Sa, Sc, X und Xb bezeichnen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, NaeI, NarI, NdeI, PstI, SphI, SalI, Scal, XhoI bzw. XbaI.



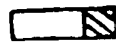
repräsentiert die Promotoren der Gene bla, lacI und neo;



repräsentiert die ribosomalen Bindungsstellen der Gene bla, cat, neo und lacI;



repräsentiert die Terminatoren t_0 und T1;



repräsentiert das regulierbare Promotor/Operator Element $P_{N25X_{10}}$ bzw. N250PSN25OP29;



repräsentiert die ribosomalen Bindungsstellen RBSII, SphI und RBSII, 3A + 5A; → repräsentiert die kodierenden Regionen unter Kontrolle dieser ribosomalen Bindungsstellen;



repräsentiert die Regionen, die für die erfindungsgemässen Affinitätspeptide sowie die selektiven Schnittstellen kodieren;



repräsentiert die Regionen, die für 2, 4 bzw. 6 Histidinreste kodieren;



repräsentiert die für die Replikation benötigte Region (repl.);



repräsentiert kodierende Regionen für Dihydrofolatreduktase (dhfr), Chloramphenicolacetyltransferase, lac-Repressor (lacI), β -Lactamase (bla), Neomycinphosphotransferase (neo) und die verschiedenen Derivate des γ -Interferons.

Abbildung 1

Schematische Darstellung des Plasmids pDS8/RBSII, SphI.

Abbildung 2

Nukleotidsequenz des XhoI/XbaI Fragments des Plasmids pDS8/RBSII, SphI. Dieses Fragment enthält das regulierbare Promotor/Operator Element $P_{N25X_{10}}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII, SphI, das dhfr-Gen, den Terminator t_0 , das cat-Gen sowie den Terminator T1. Die in Abbildung 1 aufgeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind überstrichen während die unter der Kontrolle der RBSII, SphI stehende Region, die für eine Variante der Dihydrofolatreduktase kodiert, unterstrichen ist. Zusätzlich ist der aus dem Plasmid pRB322 stammende Teil des Plasmids pDS8/RBSII, SphI schematisch dargestellt, wobei sich die angegebenen Zahlen auf die Sequenz von pBR322 beziehen (J.G. Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, pp. 77-90 [1979]).

Abbildung 3

Schematische Darstellung des Plasmids pDS5/RBSII,3A + 5A.

5 Abbildung 4

Nukleotidsequenz des Plasmids pDS5/RBSII,3A + 5A. Die in Abbildung 3 aufgeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind überstrichen während die unter Kontrolle der RBSII,3A + 5A stehende Region, die für eine Variante der Chloramphenicoltransferase kodiert, unterstrichen ist.

10

Abbildung 5

Schematische Darstellung des Plasmids pDS78/RBSII.

15 Abbildung 6

Nukleotidsequenz des Plasmids pDS78/RBSII. Die in Abbildung 5 aufgeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind überstrichen während die unter Kontrolle der RBSII stehende Region, die für eine Variante der Dihydrofolatreduktase kodiert, unterstrichen ist.

20

Abbildung 7

Schematische Darstellung des Plasmids pDS56/RBSII.

25 Abbildung 8

Nukleotidsequenz des Plasmids pDS56/RBSII. Die in Abbildung 7 aufgeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind überstrichen während die unter Kontrolle der RBSII stehende Region unterstrichen ist.

30

Abbildung 9

Schematische Darstellung des Plasmids pDMI,1.

35 Abbildung 10

Nukleotidsequenz des Plasmids pDMI,1. Die in Abbildung 9 aufgeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind überstrichen während die für Neomycinphosphotransferase (neo) bzw. lac-Repressor (lacI) kodierenden Regionen unterstrichen sind.

40

Abbildung 11

Nukleotidsequenzen der zur Konstruktion der in den Beispielen verwendeten Plasmide eingesetzten Oligonukleotide. Jeweils zwei solcher Oligonukleotide wurden zusammengefasst und als Adaptor bezeichnet. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NaeI, NarI und BglII sind überstrichen.

45

Abbildung 12

Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 1. Dieses Fragment wurde aus dem Plasmid pRC23/IFI-900 isoliert und enthält das Gen für das rekombinante humane Interferon mit Cys-Tyr-Cys als N-terminale Aminosäuren.

50

Abbildung 13

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pGLS durch Einbau des Fragments 1 in das Plasmid pDS8/RBSII,SphI. In der schematischen Darstellung von pGLS bezeichnet (Sc) die Position an der das Fragment 1 über die Schnittstelle für das Restriktionsenzym ScaI mit dem Plasmid pDS8/RBSII,SphI verknüpft wurde.

55

Abbildung 14

Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 2. Dieses Fragment kodiert für ein humanes Interferon, das am C-Terminus um 8 Aminosäuren verkürzt ist und als IFN- γ (-8) bezeichnet wird. In den angegebenen Nukleotidsequenzen ist das entsprechende Terminationscodon unterstrichen.

Abbildung 15

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pIFN- γ (-8) durch Einbau des Fragments 2 in das Plasmid pDS8/RBSII,SphI über die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII.

Abbildung 16

Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 3. Dieses Fragment trägt das regulierbare Promotor/Operator Element $P_{N25X_{10}}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII,SphI und den Adator 3, der für die Aminosäuresequenz Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg-Leu-Gly-Ser kodiert.

Abbildung 17

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI durch Einbau des Fragments 3 in das Plasmid pDS8/RBSII,SphI über die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XhoI und BamHI.

Abbildung 18

Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 4, welches bei der Konstruktion des Plasmids pHis,HIS-Xa-IFN- γ eingesetzt wurde.

Abbildung 19

Schematische Darstellung der Isolierung des Fragments 5, welches bei der Konstruktion der Plasmide pHis,HIS-Xa-IFN- γ , pHis,HIS-Ek-IFN- γ (-8) und pHis,HIS-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) eingesetzt wurde.

Abbildung 20

Schematische Darstellung der Isolierung des Fragments 6, welches bei der Konstruktion des Plasmids pHis,HIS-Xa-IFN- γ eingesetzt wurde.

Abbildung 21

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pHis,HIS-Xa-IFN- γ durch Verknüpfen der Fragmente 4, 5 und 6. Das Plasmid pHis,HIS-Xa-IFN- γ kodiert für ein IFN- γ Fusionsprotein mit Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg als zusätzlicher N-terminaler Aminosäuresequenz (His,HIS-Xa-IFN- γ).

Abbildung 22

Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 7, welches bei der Konstruktion des Plasmids pHis,HIS-Ek-IFN- γ (-8) eingesetzt wurde.

Abbildung 23

Schematische Darstellung der Isolierung des Fragments 8, welches bei der Konstruktion der Plasmide pHis,HIS-Ek-IFN- γ (-8) und pHis,HIS-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) eingesetzt wurde.

Abbildung 24

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pHis-HIS-Ek-IFN- γ (-8) durch Verknüpfen der Fragmente 5, 7 und 8. Das Plasmid pHis,HIS-Ek-IFN- γ (-8) kodiert für ein am C-Terminus um 8 Aminosäuren

verkürztes IFN- γ Fusionsprotein mit Met-His-His-Ala-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys als zusätzlicher N-terminaler Aminosäuresequenz (His₆-His-Ek-IFN- γ (-8)).

Abbildung 25

5 Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 9, welches bei der Konstruktion des Plasmids pHis₆-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) eingesetzt wurde.

Abbildung 26

10 Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pHis₆-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) durch Verknüpfen der Fragmente 5, 8 und 9. Dieses Plasmid kodiert für ein IFN- γ Fusionsprotein, das am C-Terminus um 8 Aminosäuren verkürzt ist, das am N-Terminus um die Aminosäuresequenz Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg verlängert ist und bei dem zusätzlich an der Position 2 die Aminosäure Asp durch die Aminosäure Asn ersetzt ist (His₆-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn)).

Abbildung 27

20 Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 10, welches bei der Konstruktion des Plasmids p6xHis-DHFR eingesetzt wurde.

Abbildung 28

25 Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids p6xHis-DHFR durch Verknüpfen des Fragments 10 mit dem die Replikationsregion enthaltenden XhoI/BamHI-Fragment des Plasmids pDS78/RBSII. Das Plasmid p6xHis-DHFR kodiert für ein DHFR-Fusionsprotein mit 6 Histidinen am N-Terminus [(His)₆-mDHFR].

Abbildung 29

30 Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 11, welches bei der Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR eingesetzt wurde.

Abbildung 30

35 Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR durch Verknüpfen des Fragments 11 mit dem die Replikationsregion enthaltenden XhoI/BamHI-Fragment des Plasmids pDS78/RBSII. Das Plasmid p4xHis-DHFR kodiert für ein DHFR-Fusionsprotein mit 4 Histidinen am N-Terminus [(His)₄-mDHFR].

Abbildung 31

40 Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 12, welches bei der Konstruktion des Plasmids pRBSII-6xHis eingesetzt wurde.

Abbildung 32

45 Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pRBSII-6xHis durch Verknüpfen des Fragments 12 mit dem die Replikationsregion enthaltenden XbaI/BamHI-Fragment des Plasmids pDS56/RBSII.

Abbildung 33

50 Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 13, welches bei der Konstruktion des Plasmids pRBSII-4xHis eingesetzt wurde.

55

Abbildung 34

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pRBSII-4xHis durch Verknüpfen des Fragments 13 mit dem die Replikationsregion enthaltenden XbaI/BamHI-Fragment des Plasmids pDS56/RBSII.

5

Abbildung 35

Schematische Darstellung der Konstruktion und Isolierung des Fragments 14, welches bei der Konstruktion des Plasmids pRBSII-2xHis eingesetzt wurde.

10

Abbildung 36

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pRBSII-2xHis durch Verknüpfen des Fragments 14 mit dem die Replikationsregion enthaltenden XbaI/BamHI-Fragment des Plasmids pDS56/RBSII.

15

Abbildung 37

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pDHRF-6xHis durch Verknüpfen des die Replikationsregion enthaltenden XbaI/BglII-Fragments des Plasmids pDS78/RBSII mit dem das cat-Gen enthaltenden BglII/XbaI-Fragment des Plasmids pRBSII-6xHis. Das Plasmid pDHRF-6xHis kodiert für ein DHFR-Fusionsprotein mit 6 Histidinen am C-Terminus [Met-mDHFR-(His)₆].

20

Abbildung 38

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pDHRF-2xHis durch Verknüpfen des die Replikationsregion enthaltenden XbaI/BglII-Fragments des Plasmids pDS78/RBSII mit dem das cat-Gen enthaltenden BglII/XbaI-Fragment des Plasmids pRBSII-2xHis. Das Plasmid pDHRF-2xHis kodiert für ein DHFR-Fusionsprotein mit 2 Histidinen am C-Terminus [Met-mDHFR-(His)₂].

25

Abbildung 39

Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR-4xHis durch Verknüpfen des die Replikationsregion enthaltenden XbaI/BglII-Fragments des Plasmids p4xHis-DHFR mit dem das cat-Gen enthaltenden BglII/XbaI-Fragment des Plasmids pRBSII-4xHis. Das Plasmid p4xHis-DHFR-4xHis kodiert für ein DHFR-Fusionsprotein mit je 4 Histidinen am N- und am C-Terminus [(His)₄-mDHFR-(His)₄].

35

Abbildung 40

Nukleotidsequenz des vom Plasmid pGLS kodierten IFN- γ -Gens und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

40

Abbildung 41

Nukleotidsequenz des vom Plasmid pHis,His-Xa-IFN- γ kodierten IFN- γ Fusionsgens und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

45

Abbildung 42

Nukleotidsequenz des vom Plasmid pHis,His-Ek-IFN- γ (-8) kodierten IFN- γ Fusionsgens und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

50

Abbildung 43

Nukleotidsequenz des vom Plasmid pHis,His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) kodierten IFN- γ Fusionsgens und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz.

55

Beispiel 1

Beschreibung der Plasmide, welche bei der Konstruktion der Plasmide pGLS, pHis,His-Xa-IFN- γ , pHis,His-Ek-IFN- γ (-8), pHis,His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn), p6xHis-DHFR, p4xHis-DHFR-4xHis, pDHFR-2xHis und pDHFR-6xHis verwendet wurden

A. Prinzipien

Die Plasmide pDS8/RBSII,SphI (Abb. 1 und 2), pDS5/RBSII,3A+5A (Abb. 3 und 4), pDS78/RBSII (Abb. 5 und 6) und pDS56/RBSII (Abb. 7 und 8) wurden zur Konstruktion der aufgeführten Plasmide verwendet. Mit diesen Plasmiden transformierte E. coli Zellen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen in Göttingen (seit 21.11.87 in Braunschweig) am 03.10.85 [E. coli M15 (pDS5/RBSII,3A+5A; pDML1), DSM-Nr.: 3517], am 06.08.86 [E. coli M15 (pDS8/RBSII,SphI; pDML1), DSM-Nr.: 3809], am 03.09.1987 [E. coli M15 (pDS78/RBSII; pDML1), DSM-Nr.: 4232], bzw. am 23.12.87 [E. coli M15 (pDS56/RBSII; pDML1), DSM-Nr.: 4330] nach dem Budapester Vertrag hinterlegt.

Die oben erwähnten Vektoren enthalten das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N25X_{10}}$ (Stüber et al., EMBO J. 3, 3143-3148 [1984] oder N25OPSN25OP29 und die ribosomalen Bindungsstellen RBSII,SphI, RBSII,3A+5A oder RBSII. Diese ribosomalen Bindungsstellen wurden von der ribosomalen Bindungsstelle des Promotors P_{G25} des E. coli-Phagen T5 (R. Gentz, Dissertation, Universität Heidelberg, BRD [1984]) abgeleitet und über DNA-Synthese erhalten. Auf Grund der hohen Effizienz dieser Expressionssignale können die oben erwähnten Plasmide nur dann stabil in E. coli-Zellen gehalten werden, wenn das Promotor/Operator Element durch das Binden eines lac-Repressors an den Operator reprimiert wird. Der lac-Repressor ist im lacI-Gen kodiert. $P_{N25X_{10}}$ und N25OPSN25OP29 können nur dann effizient reprimiert werden, wenn eine ausreichende Zahl von Repressormolekülen in den Zellen vorhanden ist. Daher wurde das lacI^q-Allel benutzt, das eine Promotormutante enthält, die zu einer erhöhten Expression des Repressorgens führt. Dieses lacI^q-Allel ist im Plasmid pDML1 (Abb. 9 und 10) enthalten. Dieses Plasmid trägt zusätzlich zum lacI-Gen das Neo-Gen, das den Bakterien Kanamycinresistenz verleiht, welche als Selektionsmarker benutzt wird. pDML1 ist mit den oben erwähnten Plasmiden kompatibel. E. coli-Zellen, die mit solchen Expressionsvektoren transformiert werden, müssen pDML1 enthalten, um sicherzustellen, dass der Expressionsvektor stabil in den Zellen gehalten wird. Eine Induktion dieses Systems wird durch Zugabe von IPTG ins Medium bei der gewünschten Zelldichte erreicht.

B. Plasmid pDS8/RBSII,SphI

Der Anteil von pDS8/RBSII, SphI (Abb. 1 und 2), der zwischen den Restriktionsschnittstellen für XbaI und XhoI liegt und die Replikationsregion sowie das Gen für β -Lactamase, das den Zellen Ampicillinresistenz verleiht, enthält, stammt aus dem Plasmid pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, 95-113 [1977]; Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90 [1979]). Der verbleibende Teil des Plasmids trägt das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N25X_{10}}$ (Stüber et al., supra) gefolgt von der Ribosomenbindungsstelle RBSII,SphI, die Teil eines EcoRI/BamHI-Fragments ist. Es folgt das Gen der Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus-Zelllinie AT-3000 (Chang et al., Nature 275, 617-624 [1978]; Masters et al., Gene 21, 59-63 [1983]), der Terminator t_0 des E. coli-Phagen Lambda (Schwarz et al., Nature 272, 410-414 [1978]), das Promotor-freie Gen der Chloramphenicolacetyltransferase (Marcoli et al., FEBS Letters, 110, 11-14 [1980]) und der Terminator T1 des E. coli rrnB Operons (Brosius et al., J. Mol. Biol., 148, 107-127 [1981]).

C. Plasmid pDS5/RBSII,3A+5A

Der Anteil von pDS5/RBSII,3A+5A (Abb. 3 und 4), der zwischen den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und XhoI liegt und die Replikationsregion sowie das Gen für die β -Lactamase, das den Zellen Ampicillinresistenz verleiht, enthält, stammt ursprünglich aus dem Plasmid pBR322 (Bolivar et al., supra; Sutcliffe, supra). Jedoch ist das Gen für die β -Lactamase dahingegen modifiziert, dass die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HincII und PstI eliminiert sind. Diese Veränderungen in der DNA-Sequenz wirken sich aber nicht auf die Aminosäuresequenz der β -Lactamase aus. Der verbleibende Teil des Plasmids trägt das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N25X_{10}}$ (Stüber et al., supra) gefolgt von der Ribosomenbindungsstelle RBSII,3A+5A, die Teil eines EcoRI/BamHI-Fragments ist. Es folgen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sall, PstI und HindIII, das Promotor-freie Gen der Chloramphenicolacetyltransferase (Marcoli et al., supra) und der Terminator T1 des E. coli rrnB Operons (Brosius et al., supra).

D. Plasmid pDS78/RBSII

Der Anteil von pDS78/RBSII (Abb. 5 und 6), der zwischen den Restriktionsschnittstellen für XbaI und XhoI liegt und die Replikationsregion sowie das Gen für die β -Lactamase, das den Zellen Ampicillinresistenz verleiht, enthält, stammt ursprünglich aus dem Plasmid pBR322 (Bolivar et al., supra; Sutcliffe, supra). Jedoch ist das Gen für β -Lactamase in der für das Plasmid pDS5/RBSII,3A+5A beschriebenen Weise modifiziert. Der verbleibende Teil des Plasmids trägt das regulierbare Promotor/Operator-Element N25OPSN25OP29 gefolgt von der Ribosomenbindungsstelle RBSII, die Teil eines EcoRI/BamHI-Fragments ist. Es folgen das Gen der Dihydrofolatreduktase der Maus-Zelllinie AT-3000 (Chang et al., supra; Masters et al., supra), welches so verändert wurde, dass eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BglII unmittelbar vor dem Ende des Strukturgens eingeführt wurde, der Terminator t_0 (Schwarz et al., supra), das Promotorfreie Gen der Chloramphenicolacetyltransferase (Marcoli et al., supra) und der Terminator T1 (Brosius et al., supra).

E. Plasmid pDS56/RBSII

Das Plasmid pDS56/RBSII (Abb. 7 und 8) ist dem Plasmid pDS5/RBSII,3A+5A sehr ähnlich. Im Gegensatz zu diesem enthält das Plasmid pDS56/RBSII jedoch als Expressionssignale das regulierbare Promotor/Operator-Element N25OPSN25OP29 und die Ribosomenbindungsstelle RBSII. Zusätzlich enthält pDS56/RBSII den Terminator t_0 des E. coli-Phagen Lambda (Schwarz et al., supra).

F. Plasmid pDMI,1

Das Plasmid pDMI,1 (Abb. 9 und 10) trägt das Gen der Neomycinphosphotransferase aus dem Transposon Tn5 (Beck et al., Gene 19, 327-336 [1982]), das E. coli-Zellen Kanamycinresistenz verleiht und das lac I-Gen (Farabough, Nature 274, 765-769 [1978]) mit der Promotormutation I^a (Calos, Nature 274, 762-765 [1978]), das den lac-Repressor kodiert. Ausserdem enthält das Plasmid pDMI,1 eine Region des Plasmids pACYC184 (Chang und Cohen, J. Bacteriol. 134, 1141-1156 [1978]), die alle Informationen enthält, die für die Replikation und stabile Weitergabe an die Tochterzellen notwendig sind.

Beispiel 2

Beschreibung der DNA-Adaptoren, welche bei der Konstruktion der verschiedenen Plasmide verwendet wurden

A. Prinzipien

Zur Adaptierung der ribosomalen Bindungsstelle RBSII, SphI auf das Gen für Immuninterferon (IFN- γ), zur Verkürzung dieses Gens, zur Verknüpfung von IFN- γ und IFN- γ Bruchstücken, wie z.B. IFN- γ (-8), mit einem Affinitätspeptid sowie zur Expression von DHFR-Fusionsproteinen mit mindestens zwei benachbarten Histidinresten wurden Oligonukleotide chemisch synthetisiert und nach ihrer Aufarbeitung phosphoryliert. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Adaptoren sind als doppelsträngige DNA-Sequenzen in Abbildung 11 dargestellt.

B. Synthese und Aufarbeitung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden simultan auf einem Multisyntheseapparat (beschrieben in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 181, veröffentlicht am 21.05.85) hergestellt, wobei Glas definierter Porengrösse (CPG) als Trägermaterial verwendet wurde (Kiefer et al., Immunol. Meth. 3, 69-83 [1985]; Sproat et al., Tetrahedr. Lett. 24, 5771-5774 [1983]; Adams et al., J. Amer. Chem. Soc., 105, 661-663 [1985]). Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in Wasser aufgenommen und 1 Stunde bei 4°C gelöst. Die DNA-Konzentration betrug 100 nmol/ml.

C. Phosphorylierung der Oligonukleotide

In getrennten Ansätzen wurden jeweils 150 pmol der Oligonukleotide in 20 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 und 10 mM MgCl₂ mit 2 pmol γ -[³²P]-ATP (Amersham, Braunschweig; 5000 Ci/mMol) und 1 Einheit (E) T4-Polynukleotidkinase (Gibco-BRL, Basel) während 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde 5

nmol ATP zugegeben und nach weiteren 20 Minuten bei 37 °C wurden die Reaktionen durch Erhitzen auf 65 °C beendet. Die so erhaltenen phosphorylierten Oligonukleotide wurden ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

5 Beispiel 3

Konstruktion des Plasmids pGLS

A. Prinzipien

10

Zur Konstruktion des Plasmids pGLS wurde zunächst das IFN- γ Gen mit dem Adaptor 1 (Abb.11) verbunden (Abb.12) und isoliert. Anschliessend wurde das resultierende Fragment 1 in das Plasmid pDS8/RBSII, SphI integriert (Abb.13).

15 B. Präparation des Fragments 1

4 μ g des Plasmids pRC23/IFI-900 (Europ. Patentanmeldung Publ.-Nr. 99084, veröffentlicht am 25.1.84) mit einer DNA-Konzentration von 400 μ g/ml wurden mit 10 Einheiten der Restriktionsendonuklease NdeI in core buffer (50mM Tris-HCl, pH 8, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl), für 1 Stunde bei 37 °C (Volumen 20 μ l) verdaut. Anschliessend wurde die Probe einmal mit Phenol extrahiert, Reste von Phenol mit Aether entfernt und die DNA schliesslich mit 66% Alkohol und 0,3M K-Acetat gefällt. Das Sediment wurde 2 Minuten im Speed-vac-concentrator getrocknet und in T4-Ligasepuffer (50mM Tris-HCl, pH 7,8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 500 μ M ATP) gelöst. 25 pmol des phosphorylierten Adaptors 1 (Abb.11) wurden in 1x Ligasepuffer gelöst und dieser Reaktionsmischung zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 25 μ l erreicht wurde. Die Ligierung wurde für 3 Stunden bei 22 °C durchgeführt, wobei 1 μ l DNA-Ligase (1 Weiss-Einheit, Boehringer Mannheim) eingesetzt wurde. Die Ligierung wurde durch Erhitzen der Probe für 7 Minuten auf 65 °C beendet. Die DNA wurde mit Alkohol gefällt, wie oben beschrieben getrocknet und dann in 50 μ l NcoI-Verdauungspuffer (50mM Tris-HCl, pH 8, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 50mM KCl) gelöst. 10 Einheiten NcoI wurden hinzugegeben und die Probe für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschliessend durch Erhitzen der Probe für 7 Minuten auf 65 °C inaktiviert. Nach einer Phenolextraktion wurde die DNA wie beschrieben ausgefällt und das Sediment getrocknet. Die DNA wurde in Klenow-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,2, 10mM MgSO₄, 100 μ M DTT) gelöst, dATP, dGTP, dCTP und dTTP (Endkonzentration jeweils 100 μ M) und 1 Einheit Klenow-Enzym (Boehringer, Mannheim) hinzugegeben und die Probe für 1 Stunde bei 22 °C gehalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l 0,25M EDTA beendet, die Probe mit Phenol extrahiert, die DNA wie beschrieben mit Alkohol ausgefällt und in SphI-Verdauungspuffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 6mM MgCl₂, 50mM NaCl, 6mM 2-Mercaptoäthanol) gelöst. Nach Zugabe von 10 Einheiten SphI wurde die Probe für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, die Verdauung wie beschrieben durch Erhitzen beendet, eine Phenolextraktion durchgeführt und die DNA mit Alkohol ausgefällt und getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 10 μ l Probenpuffer gelöst und die DNA-Fragmente in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laufpuffer; 40mM Tris-HCl, 20mM Na-acetat, 2mM EDTA, pH 7,8). Als Molekulargewichtsstandard diente mit HaeIII verdaute DNA des Phagen ϕ X (Gibco-BRL, Basel). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml) angefärbt, mit UV-Licht (300 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht und die IFN- γ kodierende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in eine 4x4 mm grosse Tasche in einem Agarosegel überführt (0,7% Agarosegel, Laufpuffer: 90mM Tris-Borat, 90mM Borsäure, 3mM EDTA, pH 8,3). Die Tasche wurde mit 0,7% flüssiger Agarose in 1xTBE verschlossen, um ein homogenes elektrisches Feld zu erreichen. Vor die Probe wurde ein Stück einer NA45 Membran (Schleicher und Schüll, Dassel, BRD) plaziert und die DNA auf die Membran elektrophoretisiert (5 Minuten, 15 V/cm). Nach der Waschung mit destilliertem Wasser wurde die Membran in ein Eppendorfröhrchen überführt, das 250 μ l 1,5M Lithiumacetat, 50mM Tris-HCl, pH 8 und 10mM EDTA enthielt. Die DNA wurde nun für 20 Minuten bei 65 °C eluiert. Der Membranstreifen wurde aus dem Röhrchen entfernt und die Probe einmal mit 200 μ l Phenol (pH 8) extrahiert. Die DNA wurde nach Zugabe von 20 μ l 5M Lithiumacetat und 440 μ l Isopropanol gefällt und das Sediment mit 80% Äthanol gewaschen und anschliessend getrocknet. Abschliessend wurde das Sediment in 10 μ l TE-Puffer gelöst (10mM Tris-HCl, pH 7,6, 1mM EDTA). Das so erhaltene DNA-Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 1 (Abb.12).

55

C. Präparation des Plasmids pDS8/RBSII,SphI

2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII,SphI wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym SphI geschnitten. Danach wurde die resultierende lineare Plasmid DNA mit einer limitierenden Menge des Restriktionsenzym
 5 Scal inkubiert, wodurch die DNA nur an ungefähr 50% der vorhandenen Scal Schnittstellen geschnitten wurde. Nun wurde die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA wie beschrieben ausgefällt. Das Sediment wurde getrocknet, in 20 µl Puffer (50mM Tris-HCl, pH 8) gelöst und 1E CIP (calf intestinal phosphatase, Boehringer Mannheim) zugegeben. Die Probe wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, das
 10 Enzym durch eine Phenolextraktion entfernt und die DNA ausgefällt. Nachdem die DNA gelöst worden war, wurde das Scal/SphI-Fragment, das Teile des cat-Gens, den Terminator T1, die Replikationsregion, das bla-Gen, den Promotor N25x/o und die ribosomale Bindungsstelle RBSII,SphI enthielt aus einem 1%igen Agarosegel isoliert und elektrophoretisch, wie oben beschrieben, auf eine NA45-Membran transferiert. Die Elution der DNA, Alkoholfällung und Auflösen in 10 µl TE-Puffer wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, durchgeführt. Ungefähr 1 pmol des gewünschten Vektorfragments wurden erhalten.

D. Zusammensetzen des Plasmids pGLS

0,05 pmol des Vektorfragments wurden mit 0,05 pmol Insert-DNA (Fragment 1) in Ligasepuffer ligiert (s.o.). Eine Kontrollligierung ohne Insert-DNA wurde parallel dazu durchgeführt. E. coli M15 Zellen enthal-
 20 tend Plasmid pDMI,1 wurden nach der Methode von Morrison (Methods Enzymol. 68, 326-331 [1979]) für die Transformation vorbereitet. Die Ligierungs- mischungen wurden nach Erhitzen für 7 Minuten bei 65°C zu 200 µl dieser kompetenten Zellen hinzugefügt. Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis gehalten, dann für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, und nach der Zugabe von 0,5 ml LB-Medium während 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf LB-Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml
 25 Kanamycin enthielten, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Transformation der Kontrollligierung ergab keine Transformanten. Die Ligierung mit Fragment 1 dagegen etwa 200 Kolonien. Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in ein Röhrchen überführt, das 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielt, und 12 Stunden im Schüttelinkubator gehalten. Danach wurden die Zellen sedimentiert und die Plasmid-DNA nach der Methode von Birnboim
 30 und Doly (Nucleic Acids Res. 7, 1515-1523 [1979]) isoliert.

Je 1 µg der isolierten Plasmide wurde mit SphI und XbaI verdaut, um nachzuprüfen, ob ein Fragment, welches das IFN-γ Gen und den Terminator T1 enthält, in diesen Plasmiden enthalten ist. Alle analysierten DNA-Proben enthielten das erwartete DNA-Fragment von ca. 1 kb. Diese Plasmide erhielten die Bezeich-
 35 nung pGLS (Abb.13).

E. Sequenzanalyse des in pGLS integrierten IFN-γ Gens

Um nachzuweisen, dass die richtige IFN-γ Sequenz in dem Plasmid pGLS enthalten ist, wurde die doppelsträngige zirkuläre Plasmid-DNA sequenziert, wobei ein mit [γ-³²P]-ATP markierte Startersequenz
 40 (primer) benutzt wurde. Diese Startersequenz enthält die Nukleotide von Position 199-218 des Plasmids pDS8/RBSII,SphI und endet 6 Nukleotide vor dem ATG der SphI-Schnittstelle.

0,3 pmol der isolierten Plasmid-DNA wurden mit Alkohol gefällt, das Sediment einmal mit 80% Aethanol gewaschen, getrocknet und schliesslich in 8 µl 1/4 TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 2 pmol der Startersequenz wurde die Probe 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Dann wurde die DNA nach der Methode von
 45 Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-6567 [1977]) sequenziert. Da ein radioaktiver markierter "Primer" verwendet wurde, wurden alle Reaktionen mit unmarkierten Deoxynukleotidtriphosphaten durchgeführt. Die DNA-Sequenzanalyse ergab, dass die korrekte IFN-γ-Sequenz in das Plasmid pGLS integriert worden war (Aminosäuresequenz siehe Abb.40).

50 Beispiel 4Konstruktion des Plasmids pIFN-γ(-8)A. Prinzipien

55 Zur Konstruktion des Plasmids pIFN-γ(-8) wurde zunächst der Adaptor 2 (Abb.11) mit der einzigen HinfI-Schnittstelle im IFN-γ Gen verbunden. Aufgrund eines Translationsstopcodons in diesem Adaptor wird somit die C-terminale Region des IFN-γ Proteins um 8 Aminosäuren verkürzt (Abb.14). Anschliessend

wurde das resultierende Fragment 2 in das Plasmid pDS8/RBSII,SphI integriert (Abb.15).

B. Präparation des Fragments 2

- 5 3 pmol des Plasmids pGLS wurden mit 15E HinfI verdaut (50 µl Volumen, 1 h, 37 °C). Anschliessend wurde das Restriktionsenzym inaktiviert (7 Min. bei 65 °C), die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert, mit K-acetat und Alkohol gefällt und getrocknet. Das Sediment wurde in 50 µl Ligasepuffer gelöst. 100 pmol phosphorylierte Oligonukleotide (Adaptor 2) wurden mit 10 µl HinfI geschnittenem Plasmid pGLS vermischt und nach Zugabe von 25 µl Ligasepuffer und 1E T4-DNA-Ligase während 12 Stunden bei 22 °C inkubiert.
- 10 Die Reaktion wurde, wie oben beschrieben, durch Erhitzen der Probe beendet und die DNA gefällt. Nun folgte eine Verdauung mit den Restriktionsenzymen EcoRI (15E) und HindIII (20E) für 2 Stunden bei 37 °C. Nach Hitzeinaktivierung, Phenolextraktion, ausäthern und Alkoholfällung wurde die Probe in 10 µl Probenpuffer gelöst und die DNA-Fragmente in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (300 nm), nach Anfärbung mit Ethidiumbromid, sichtbar gemacht. Die Bande, die
- 15 das IFN- γ Gen enthielt wurde aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und, wie oben beschrieben, auf eine NA45-Membran elektrophoretisiert. Die DNA wurde wie beschrieben, eluiert und erhielt die Bezeichnung Fragment 2 (Abb.14).

C. Präparation des Plasmids pDS8/RBSII,SphI

- 20 2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII,SphI wurden mit 10E EcoRI und 10E HindIII für 1 Stunde bei 37 °C in einem Volumen von 50 µl verdaut. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme und einer Alkoholfällung wurde das DNA-Sediment in 10 µl Probenpuffer gelöst. Nach Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel wurde das EcoRI/HindIII-Fragment, das den Terminator t_0 , das cat-Gen, den Terminator T1, die Replikationsregion, das
- 25 bla-Gen und den Promotor $P_{N25X/O}$ enthält aus dem Gel ausgeschnitten und, wie oben beschrieben, eluiert.

D. Zusammensetzen des Plasmids pIFN- γ (-8)

- 10 µl des isolierten EcoRI/HindIII-Vektorfragments und die Hälfte des isolierten Fragments 2 wurden mit
- 30 1E T4-Ligase inkubiert (22 °C, 3 Stunden). Eine Kontrollligierung ohne Hinzufügen des Fragments 2 wurde parallel dazu durchgeführt. Die Ligierungen wurden, wie beschrieben, durch Erhitzen der Probe beendet.
- Die Transformationen wurden nach der Methode von Morrison (supra) durchgeführt, wobei der E. coli-Stamm M15, der das Plasmid pDM1.1 enthielt, verwendet wurde. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert. Die Platten wurden für 15 Stunden
- 35 bei 37 °C im Brutschrank gehalten.
- Auf den Kontrollplatten (= Kontrollligierung) wurden keine Transformanten gefunden. Die Ligierung, bei der Vektor-DNA und Fragment 2 eingesetzt wurden, ergab etwa 500 Kolonien. Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in 10 ml LB-Medium überführt und, wie beschrieben, wachsen gelassen. Die Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim and Doly (supra) isoliert. Je 4 µl der
- 40 isolierten und in TE-Puffer gelösten Plasmid-DNA wurden mit je 2E EcoRI und HindIII, wie beschrieben, geschnitten. Aus allen getesteten Plasmiden konnte ein Fragment mit der erwarteten Länge von ca. 450 bp ausgeschnitten werden. Diese Plasmide erhielten die Bezeichnung pIFN- γ (-8) (Abb.15).

E. Sequenzanalyse des Plasmids pIFN- γ (-8)

- 45 Die Sequenzanalyse wurde, wie in Beispiel 3 beschrieben, durchgeführt. Als Startersequenz wurde jedoch ein Oligonukleotid verwendet, das die Nukleotide von Position 928-896 des Plasmids pDS8/RBSII,SphI enthält und somit die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erlaubt, die vor dem Terminator t_0 integriert wurden. Die Sequenzanalyse bestätigte die gewünschte Sequenz des IFN- γ Gens, welches
- 50 für ein um 8 Aminosäuren (am Carboxylende) verkürztes IFN- γ Protein kodiert.

Beispiel 5Konstruktion des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI

5 A. Prinzipien

Zur Konstruktion des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI wurde zunächst der Adaptor 3 (Abb.11), der für ein Affinitätspeptid kodiert, welches zwei benachbarte Histidine und eine Schnittstelle des Faktors Xa enthält, mit der ribosomalen Bindungsstelle RBSII,SphI verbunden. Anschliessend wurde das
 10 Fragment 3 (Abb.16), enthaltend den Promotor $P_{N25X_{10}}$ sowie genanntes Affinitätspeptid, isoliert und in das Plasmid pDS8/RBSII,SphI integriert (Abb.17).

B. Präparation des Fragments 3

15 2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII,SphI wurden mit dem Restriktionsenzym SphI geschnitten. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C für 7 Minuten beendet, die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA mit Alkohol und K-acetat ausgefällt. Das Sediment wurde in 10 µl Ligasepuffer aufgenommen, 25 pmol des phosphorylierten Adaptors 3 (Abb. 11), gelöst in Ligasepuffer, zugegeben und nach Zugabe von 1E T4-DNA-Ligase für 3 Stunden bei 22°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen
 20 (7 Minuten, 65°C) beendet und die DNA, nach einer Phenolextraktion und anschliessender Behandlung mit Aether, mit Alkohol und K-acetat ausgefällt. Das Sediment wurde in 30 µl Puffer gelöst, je 10E der Restriktionsenzyme BamHI und XhoI wurden zugegeben und die Mischung bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Anschliessend wurden 3,5 µl 10-fach konzentrierter Probenpuffer für Polyacrylamidgele zugegeben und die Mischung für 7 Minuten bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde in einem 6%igen Polyacrylamidgel
 25 aufgetrennt und das durch XhoI und BamHI freigesetzte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde, wie beschrieben, eluiert und erhielt die Bezeichnung Fragment 3 (Abb.16).

C. Präparation des Plasmids pDS8/RBSII,SphI

30 2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII,SphI wurden mit je 10E der Restriktionsenzyme BamHI und XhoI geschnitten. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme wurde die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA mit Alkohol und K-acetat gefällt. Das Sediment wurde in 50 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8, resuspendiert. 1E CIP (siehe oben) wurde zugegeben und die Probe bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die DNA, nach Zugabe von Probenpuffer, in einem 6%igen
 35 Polyacrylamidgel aufgetrennt und der Plasmidumpf, wie beschrieben, aus dem Gel eluiert.

D. Zusammensetzen des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI

Das oben beschriebene Fragment 3 wurde mit dem Vektorumpf ligiert (22°C, 2E T4-DNA-Ligase, 25
 40 µl Ligasepuffer). Eine Kontrollligierung ohne Zugabe von Fragment 3 wurde parallel dazu durchgeführt. Die Ligierungsansätze wurden, wie oben beschrieben, in den E. coli-Stamm M15, der das Plasmid pDM1,1 enthielt, transformiert und auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Die Transformation der Kontrollligierung ergab keine Transformanten. Die Transformation des Ligierungsansatzes mit Fragment 3 ergab etwa 100 Kolonien. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml LB-Medium, wie oben
 45 beschrieben, aufgewachsen und die Plasmid-DNA nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Alle Plasmide enthielten die durch den Adaptor neu eingeführten Schnittstellen für NaeI und NarI (siehe Abb.17). Die Sequenzanalyse der Plasmid-DNA wurde, wie oben beschrieben (Beispiel 3,F), durchgeführt und bestätigte, dass der Adaptor 3 korrekt in den Vektor integriert wurde. Diese Plasmide erhielten die Bezeichnung pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI (Abb.17).

50

Beispiel 6Konstruktion des Plasmids pHIS,HIS-Xa-IFN-γ

55 A. Prinzipien

Zur Konstruktion des Plasmids pHIS,HIS-Xa-IFN-γ wurden die folgenden DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden (Abb.21): 1), das mit dem Adaptor 4 (Abb.11) verbundene IFN-γ Gen des Plasmids

pGLS (Fragment 4, Abb.18); 2), die Signaleinheit des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI, die den Promotor $P_{N25X_{10}}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII,SphI und die für die benachbarten Histidine und für die Erkennungsstelle des Faktors Xa kodierende Region enthält (Fragment 6, Abb.20); und 3), die Replikationsregion mit dem β -Lactamase Gen aus dem Plasmid pDS5/RBSII,3A + 5A (Fragment 5, Abb.19).

5

B. Präparation des Fragments 4

2 pmol des Plasmids pGLS wurden mit dem Restriktionsenzym NdeI geschnitten. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, ausgefällt. Das Sediment wurde in 10 μ l Ligasepuffer gelöst. 50 pmol des phosphorylierten Adaptors 4 (Abb.11), gelöst in Ligasepuffer, wurden dem NdeI geschnittenen Plasmid pGLS zugegeben und die Probe mit 2E Ligase inkubiert (22 °C, 3 Stunden). Nach Hitzeinaktivierung der Ligase wurde die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, ausgefällt. Das Sediment wurde gelöst und die DNA mit den Restriktionsenzymen NarI und XbaI geschnitten. Nach Zugabe von Probenpuffer, 7-minütigem Erhitzen der Mischung bei 65 °C und Auftrennung der DNA in einem 6%igen Polyacrylamidgel wurde das NarI/XbaI-Fragment, das das IFN- γ -Gen enthielt, wie beschrieben, isoliert. Dieses Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 4 (Abb.18).

20

C. Präparation des Fragments 5

2 pmol des Plasmids pDS5/RBSII,3A + 5A wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI geschnitten. Die Mischung wurde, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und die DNA in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Fragment, welches das bla-Gen und die Replikationsregion enthielt, wurde, wie beschrieben, aus dem Gel isoliert. Dieses Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 5 (Abb.19).

25

D. Präparation des Fragments 6

2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und NarI geschnitten. Nach Aufarbeitung der Probe und Gelelektrophorese wurde das Fragment 6 isoliert, welches den Promotor $P_{N25X_{10}}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII,SphI sowie den Bereich enthält, der für die benachbarten Histidine und die Erkennungsstelle für den Faktor Xa kodiert (Abb.20).

E. Zusammensetzen des Plasmids pHis,HIS-Xa-IFN- γ

Je 0,5 pmol der Fragmente 4 (Abb.18), 5 (Abb.19) und 6 (Abb.20) wurden in Ligasepuffer mit 2E T4-DNA-Ligase inkubiert (22 °C, 5 Stunden). Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz, wie oben beschrieben, in den E. coli-Stamm M15, der das Plasmid pDML1 enthielt, transformiert und das Transformationsgemisch auf LB-Agarplatten, die 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert. Etwa 100 Transformanten wurden nach Inkubation bei 37 °C über Nacht erhalten. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml LB-Medium, wie beschrieben, aufgewachsen und die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Alle Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI, BamHI und XbaI geschnitten und die Fragmente in 6%igen Polyacrylamidgelen analysiert. Die Restriktionsenzymanalyse ergab, dass die Plasmide die 3 gewünschten Fragmente enthielten. Die Sequenzanalysen wurden wie beschrieben (Beispiel 3,F) durchgeführt und zeigten, dass der Adaptor 4 korrekt mit dem IFN- γ -Gen fusioniert worden war. Diese Plasmide erhielten den Namen pHis,HIS-Xa-IFN- γ (Abb.21). Das von diesen Plasmiden kodierte IFN- γ Fusionsprotein (Aminosäuresequenz siehe Abb.41) erhielt die Bezeichnung His,HIS-Xa-IFN- γ .

50

Beispiel 7

Konstruktion des Plasmids pHis,HIS-Ek-IFN- γ (-8)

A. Prinzipien

Zur Konstruktion des Plasmids pHis,HIS-Ek-IFN- γ (-8) wurden die folgenden 3 DNA Fragmente miteinander verbunden (Abb.24): 1), ein Fragment aus dem Plasmid pDS8/RBSII,SphI-His,HIS-Xa-BamHI enthaltend den Promotor $P_{N25X_{10}}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII,SphI und die für die benachbarten Histidine kodierende Region, welche mit Hilfe des Adaptors 5 (Abb.11) um eine für die Erkennungsstelle der

Enterokinase (EK)-kodierende Region verlängert wurde (Fragment 7, Abb.22); 2), ein Fragment aus dem Plasmid pIFN- γ (-8), welches das Gen für IFN- γ (-8) enthält (Fragment 8, Abb.23); und 3), ein Fragment aus dem Plasmid pDS5/RBSII,3A + 5A mit der Replikationsregion und dem β -Lactamase Gen (Fragment 5, Abb.19). Die Präparation des letztgenannten Fragments wurde in Beispiel 6 beschrieben.

5

B. Präparation des Fragments 7

4 pmol des Plasmids pDS8/RBSII,SphI-His,His-Xa-BamHI wurden mit dem Restriktionsenzym NaeI geschnitten. Anschliessend wurde das Enzym hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, gefällt. Das Sediment wurde in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen. 1,5 pmol der geschnittenen DNA wurden in einem Volumen von 200 μ l mit 30 pmol des phosphorylierten Adaptors 5 (Abb.11) und 7E T4-DNA-Ligase während 14 Stunden in Ligasepuffer inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Anschliessend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, gefällt. Das Sediment wurde in Probenpuffer aufgenommen und die Mischung für 7 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach wurde die DNA in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. 0,2 pmol des XhoI/NdeI-Fragments, enthaltend den Promotor P_{N25X10}, die ribosomalen Bindungsstelle RBSII,SphI sowie den für die benachbarten Histidine und für die Erkennungsstelle der Enterokinase kodierenden Bereich, wurden, wie beschrieben, aus dem Gel isoliert. Dieses DNA-Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 7 (Abb.22).

20

C. Präparation des Fragments 8

0,5 pmol des Plasmids pIFN- γ (-8) wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und XbaI geschnitten. Anschliessend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, gefällt. Das Sediment wurde in Probenpuffer aufgenommen und die Mischung für 7 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die DNA wurde dann in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. 0,05 pmol des NdeI-XbaI-Fragments, enthaltend das IFN- γ (-8) Gen, den Terminator t₀, das cat-Gen sowie den Terminator T1 wurden, wie beschrieben, aus dem Gel isoliert. Dieses DNA-Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 8 (Abb.23).

30

D. Zusammensetzen des Plasmids pHis,His-Ek-IFN- γ (-8)

0,006 pmol des Fragments 5 (Abb.19), 0,02 pmol des Fragments 7 (Abb.22) und 0,005 pmol des Fragments 8 (Abb.23) wurden in Ligasepuffer in einem Volumen von 30 μ l mit 0,5 E T4-DNA-Ligase für 3 Stunden bei 15 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz, wie oben beschrieben, in den E. coli Stamm M15₊, der das Plasmid pDML1 enthielt, transformiert und das Transformationsgemisch auf LB-Platten, die 100 μ g/ml Ampicillin, 25 μ g/ml Kanamycin und 5 μ g/ml Chloramphenicol enthielten, ausplattiert. Nach Inkubation der Platten für 24 Stunden bei 37 °C, wurden 2 der erhaltenen Transformanten in 10 ml LB-Medium, enthaltend 100 μ g/ml Ampicillin, 25 μ g/ml Kanamycin und 5 μ g/ml Chloramphenicol, aufgewachsen und die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Die Plasmide wurden hinsichtlich ihrer Grösse in 0,7%igen Agarosegelen und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII, HinfI, NdeI, SphI, XbaI und XhoI in 6%igen Polyacrylamidgelen analysiert. Beide Plasmide enthielten die gewünschten 3 DNA-Fragmente in der richtigen Orientierung zueinander. Die Sequenzanalysen, die wie in Beispiel 3,F beschrieben, durchgeführt wurden, ergaben, dass die ribosomale Bindungsstelle RBSII,SphI mit den nachfolgenden Elementen korrekt mit IFN- γ (-8) Gen verbunden worden waren. Diese Plasmide erhielten die Bezeichnung pHis,His-Ek-IFN- γ (-8) (Abb.24). Das von diesen Plasmiden kodierte IFN- γ -Fusionsprotein (Aminosäuresequenz, Abb.42) erhielt die Bezeichnung His,His-Ek-IFN- γ (-8).

50 Beispiel 8

Konstruktion des Plasmids pHis,His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn)

A. Prinzipien

55

Zur Konstruktion des Plasmids pHis,His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) wurden die folgenden 3 DNA-Fragmente miteinander verbunden (Abb.26): 1., ein Fragment aus dem Plasmid pIFN- γ (-8), welches das IFN- γ (-8) Gen enthielt (Fragment 8, Abb.23, dessen Herstellung in Beispiel 7 beschrieben wurde); 2., ein Fragment aus

dem Plasmid pDS8/RBSII, SphI-His, His-Xa-BamHI enthaltend den Promotor $P_{N25X_{AO}}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII, SphI sowie die für die benachbarten Histidine und die für die Erkennungsstelle des Faktors Xa kodierenden Region, welche mit Hilfe des Adaptors 6 (Abb.11) verlängert wurde, so dass durch Verknüpfung mit dem unter 1) beschriebenen Fragment das IFN- γ (-8)-Derivat IFN- γ (-8)(Asn) kodiert wird (Fragment 9, Abb.25); und 3., ein Fragment aus dem Plasmid pDS5/RBSII, 3A + 5A mit der Replikationsregion und dem Gen für β -Lactamase (Fragment 5, Abb.19, dessen Herstellung in Beispiel 6 beschrieben wurde).

B. Präparation des Fragments 9

2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII, SphI-His, His-Xa-BamHI wurden mit dem Restriktionsenzym NarI geschnitten. Anschliessend wurde das Enzym hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, gefällt. Das Sediment wurde in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen. 1 pmol der geschnittenen DNA wurde in einem Volumen von 150 μ l mit 30 pmol des phosphorylierten Adaptors 6 (Abb.11) und 5 E T4-DNA-Ligase für 14 Stunden bei 20°C in Ligasepuffer inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Anschliessend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert, die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, gefällt. Das Sediment wurde in Probenpuffer aufgenommen und der Ansatz für 7 Minuten bei 65°C inkubiert. Die resultierende DNA-Mischung wurde dann in einem 6%igen Polyacrylamidgel getrennt. 0,25 pmol des XhoI/NdeI-Fragments mit dem Promotor $P_{N25X_{AO}}$, der ribosomalen Bindungsstelle RBSII, SphI und der Region, die für die benachbarten Histidine, für die Erkennungsstelle des Faktors Xa sowie für die Aminosäure Asn kodiert, wurden, wie beschrieben, aus dem Gel isoliert. Dieses DNA-Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 9 (Abb.25).

C. Zusammensetzen des Plasmids pHis, His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn)

0,006 pmol des Fragments 5 (Abb.19), 0,005 pmol des Fragments 8 (Abb.23) und 0,02 pmol des Fragments 9 (Abb.25) wurden in 30 μ l Ligasepuffer und 0,5 E T4-DNA-Ligase für 3 Stunden bei 15°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz, wie oben beschrieben, in den E. coli Stamm M15, der das Plasmid pDM1,1 enthielt, transformiert und das Transformationsgemisch auf LB-Platten enthaltend 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden 2 Kolonien, wie beschrieben, in 10 ml LB-Medium, enthaltend 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin, aufgewachsen und die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Die Plasmide wurden hinsichtlich ihrer Grösse in 0,7%igen Agarosegelen und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII, HinfI, NdeI, SphI, XbaI und XhoI in 6%igen Polyacrylamidgelen analysiert. Eines der beiden Plasmide enthielt die gewünschten 3 DNA-Fragmente in der richtigen Orientierung zueinander. Die Sequenzanalyse dieses Plasmids wurde, wie beschrieben (Beispiel 3,F), durchgeführt, und sie ergab, dass die ribosomale Bindungsstelle RBSII, SphI mit den nachfolgenden Elementen korrekt mit der Region, die für IFN- γ (-8)(Asn) kodiert, verknüpft worden war. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pHis, His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) (Abb.26). Das von diesem Plasmid kodierte IFN- γ Fusionsprotein (Aminosäuresequenz siehe Abb.43) erhielt die Bezeichnung His, His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn).

Beispiel 9

Konstruktion des Plasmids p6xHis-DHFR

A. Prinzipien

Zur Konstruktion des Plasmids p6xHis-DHFR wurden die folgenden DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden (Abb.28): 1., die mit dem Adaptor 7 (Abb.11) verbundene Signaleinheit des Plasmids pDS78/RBSII mit dem Promotor N25OPSN25OP29 sowie die Ribosomenbindungsstelle RBSII (Fragment 10, Abb.27) und 2., das grössere der beiden XhoI/BamHI-Fragmente des Plasmids pDS78/RBSII (Abb.28).

B. Präparation des Fragments 10

2 pmol des Plasmids pDS78/RBSII wurden mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie

beschrieben, ausgefällt. Das Sediment wurde in 10 µl Ligasepuffer gelöst. 50 pmol des phosphorylierten Adaptors 7 (Abb.27), gelöst in Ligasepuffer, wurden dem geschnittenen Plasmid zugegeben und die Probe mit 2E Ligase inkubiert (22°C, 3 Stunden). Nach Hitzeinaktivierung der Ligase wurde die Probe mit Phenol extrahiert, ausgeäthert und die DNA, wie beschrieben, ausgefällt. Das Sediment wurde gelöst und die DNA mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI geschnitten. Nach Zugabe von Probenpuffer, 7-minütigem Erhitzen der Mischung bei 65°C und Auftrennung der DNA in einem 6%igen Polyacrylamidgel wurde das XhoI/BamHI-Fragment mit dem Promotor N25OPSN25OP29, der Ribosomenbindungsstelle RBSII und dem für 6 Histidine kodierenden Bereich, wie beschrieben, isoliert. Dieses Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 10 (Abb.27).

10

C. Präparation des BamHI/XhoI-Fragments des Plasmids pDS78/RBSII

2 pmol des Plasmids pDS78/RBSII wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI geschnitten. Nach Aufarbeitung der Probe und Gelelektrophorese wurde das Fragment isoliert, welches die Replikationsregion enthält (Abb.28).

15

D. Zusammensetzen des Plasmids p6xHis-DHFR

Je 0,1 pmol der besagten Fragmente wurden in Ligasepuffer mit 2E T4-DNA-Ligase inkubiert (22°C, 3 Stunden). Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die Mischung, wie oben beschrieben, in den E. coli-Stamm M15, der das Plasmid pDML1 enthält, transformiert, das Transformationsgemisch auf LB-Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml LB-Medium, wie beschrieben, aufgewachsen und die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen XhoI und BamHI ergab, dass die Plasmide die 2 gewünschten Fragmente enthielten. Die Sequenzanalyse wurde, wie beschrieben (Beispiel 3,E), durchgeführt und bestätigte, dass der Adaptor 7 korrekt mit der Ribosomenbindungsstelle verknüpft worden war. Diese Plasmide, die das DHFR-Fusionsprotein (His)₆-mDHFR kodieren, erhielten die Bezeichnung p6xHis-DHFR (Abb.28).

25

30 Beispiel 10

Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR

Die Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR wurde analog zur Konstruktion des Plasmids p6xHis-DHFR (Beispiel 9) durchgeführt, wobei folgende DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden wurden (Abb.30): 1., die mit dem Adaptor 8 (Abb. 11) verbundene Signaleinheit des Plasmids pDS78/RBSII mit dem Promotor N25OPSN25OP29 sowie der Ribosomenbindungsstelle RBSII (Fragment 11, Abb.29) und 2., das grössere der beiden XhoI/BamHI-Fragmente des Plasmids pDS78/RBSII (Abb.30). Das resultierende Plasmid p4xHis-DHFR kodiert das DHFR-Fusionsprotein (His)₄-mDHFR.

40

Beispiel 11

Konstruktion des Plasmids pRBSII-6xHis

45

A. Prinzipien

Zur Konstruktion des Plasmids pRBSII-6xHis wurden die folgenden DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden (Abb.32): 1., die um den Adaptor 9 (der für 6 Histidine kodiert) verlängerte Region aus dem Plasmid pDS56/RBSII mit dem Terminator t₀, dem cat-Gen und dem Terminator T1 (Fragment 12, Abb.31) und 2., das XbaI/BamHI-Fragment aus dem Plasmid pDS56/RBSII mit der Replikationsregion, dem bla-Gen, dem Promotor N25OPSN25OP29 und der Ribosomenbindungsstelle RBSII (Abb.32).

50

B. Präparation des Fragments 12

2 pmol des Plasmids pDS56/RBSII wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten. Nach Aufarbeitung der Probe wurden dem geschnittenen Plasmid 50 pmol des phosphorylierten Adaptors 9 zugegeben und die Probe mit T4-DNA-Ligase, wie beschrieben, inkubiert. Nach Aufarbeitung des Ligierungsansatzes wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI geschnitten und das

55

BamHI/XbaI-Fragment mit der für 6 Histidine kodierenden Region, dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1, wie beschrieben, isoliert. Dieses Fragment erhielt die Bezeichnung Fragment 12 (Abb.31).

C. Präparation des XbaI/BamHI-Fragments des Plasmids pDS56/RBSII

2 pmol des Plasmids pDS56/RBSII wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI geschnitten und das Fragment mit der Replikationsregion, dem bla-Gen dem Promotor N25OPSN25OP29 und der Ribosomenbindungsstelle RBSII wurde, wie beschrieben, isoliert (Abb.32).

D. Zusammensetzen des Plasmids pRBSII-6xHis

Je 0,1 pmol der isolierten Fragmente wurden, wie beschrieben (Beispiel 9,D), ligiert und anschliessend in den E. coli-Stamm M15 (pDML1) transformiert. Nach Plattierung und Inkubation (Beispiel 9,D) wurden einzelnen Kolonien in 10 ml Medium, wie beschrieben, aufgewachsen und die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen BamHI und XbaI ergab, dass die Plasmide die 2 gewünschten Fragmente enthielten. Die Sequenzanalyse (Beispiel 3,E) bestätigte, dass der Adaptor 9 korrekt in die Plasmid-DNA eingeführt wurde. Diese Plasmide erhielten die Bezeichnung pRBSII-6xHis.

Beispiel 12

Konstruktion des Plasmids pRBSII-4xHis

Die Konstruktion des Plasmids pRBSII-4xHis wurde analog zur Konstruktion des Plasmids pRBSII-6xHis (Beispiel 11) durchgeführt, wobei folgende DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden wurden (Abb.34): 1., die um den Adaptor 10 (der für 4 Histidine kodiert) verlängerte Region aus dem Plasmid pDS56/RBSII mit dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1 (Fragment 13, Abb.33) und 2., das XbaI/BamI-Fragment aus dem Plasmid pDS56/RBSII mit der Replikationsregion, dem bla-Gen, dem Promotor N25OPSN25OP29 und der Ribosomenbindungsstelle RBSII (Abb. 34).

Beispiel 13

Konstruktion des Plasmids pRBSII-2xHis

Die Konstruktion des Plasmids pRBSII-2xHis wurde analog zur Konstruktion des Plasmids pRBSII-6xHis (Beispiel 11) durchgeführt, wobei folgende DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden wurden (Abb.36): 1., die um den Adaptor 11 (der für 2 Histidine kodiert) verlängerte Region aus dem Plasmid pDS56/RBSII mit dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1 (Fragment 14, Abb.35) und 2., das XbaI-BamHI-Fragment aus dem Plasmid pDS56/RBSII mit der Replikationsregion, dem bla-Gen, dem Promotor N25OPSN25OP29 und der Ribosomenbindungsstelle RBSII (Abb.36).

Beispiel 14

Konstruktion des Plasmids pDHFR-6xHis

A. Prinzipien

Zur Konstruktion des Plasmids pDHFR-6xHis wurden die folgenden DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden (Abb.37): 1., das XbaI/BglII-Fragment aus dem Plasmid pDS78/RBSII mit der Replikationsregion, dem bla-Gen, dem Promotor N25OPSN25OP29, der Ribosomenbindungsstelle RBSII und dem dhfr-Gen und 2., das BglII/XbaI-Fragment aus dem Plasmid pRBSII-6xHis mit der für 6 Histidine kodierenden Region, dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1. Das resultierende Plasmid pDHFR-6xHis kodiert das DHFR-Fusionsprotein Met-mDHFR-(His)₆.

B. Präparation des XbaI/BglII-Fragments des Plasmids pDS78/RBSII

2 pmol des Plasmids pDS78/RBSII wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und BglII geschnitten. Nach der Aufarbeitung der Probe wurde das XbaI/BglII-Fragment mit der Replikationsregion, dem bla-Gen,

dem Promotor N25OPSN25OP29, der Ribosomenbindungsstelle RBSII und dem dhfr-Gen, wie beschrieben, isoliert.

C. Präparation des BglII/XbaI-Fragments des Plasmids pRBSII-6xHis

5

2 pmol des Plasmids pRBSII-6xHis wurden mit den Restriktionsenzymen BglII und XbaI geschnitten. Nach Aufarbeitung der Probe wurde das BglII/XbaI-Fragment mit der für 6 Histidine kodierenden Region, dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1, wie beschrieben, isoliert.

10 D. Zusammensetzen des Plasmids pDHFR-6xHis

Je 0,1 pmol der isolierten Fragmente wurden, wie beschrieben (Beispiel 9,D), ligiert und in den E. coli-Stamm M15 (pDM1,1) transformiert. Nach Plattierung und Inkubation (Beispiel 9,D) wurden einzelne Kolonien in 10 ml Medium wie beschrieben, aufgewachsen und die Plasmide nach der Methode von Birnboim und Doly (supra) isoliert. Eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen XbaI und BglII ergab, dass die beiden Fragmente in der gewünschten Weise miteinander verbunden waren. Diese Plasmide erhielten die Bezeichnung pDHFR-6xHis.

Beispiel 15

20

Konstruktion des Plasmids pDHFR-2xHis

Die Konstruktion des Plasmids pDHFR-2xHis, welches das DHFR-Fusionsprotein Met-mDHFR-(His)₂ kodiert, wurde analog zur Konstruktion des Plasmids pDHFR-6xHis (Beispiel 14) durchgeführt, wobei folgende DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden wurden (Abb.38): 1., das XbaI/BglII-Fragment aus dem Plasmid pDS78/RBSII mit der Replikationsregion, dem bla-Gen, dem Promotor N25OPSN25OP29, der Ribosomenbindungsstelle RBSII und dem dhfr-Gen und 2., BglII/XbaI-Fragment aus dem Plasmid pRBSII-2xHis mit der für 2 Histidine kodierenden Region, dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1.

30

Beispiel 16

Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR-4xHis

Die Konstruktion des Plasmids p4xHis-DHFR-4xHis, welches das DHFR-Fusionsprotein (His)₄-mDHFR-(His)₄ kodiert, wurde analog zur Konstruktion des Plasmids pDHFR-6xHis (Beispiel 14) durchgeführt, wobei folgende DNA-Fragmente isoliert und miteinander verbunden wurden (Abb.39): 1., das XbaI/BglII-Fragment aus dem Plasmid p4xHis-DHFR mit der Replikationsregion, dem bla-Gen, dem Promotor N25OPSN25OP29, der Ribosomenbindungsstelle RBSII, 4xHis und dem dhfr-Gen und 2., das BglII/XbaI-Fragment aus dem Plasmid pRBSII-4xHis mit der für 4 Histidine kodierenden Region, dem Terminator t_0 , dem cat-Gen und dem Terminator T1.

40

Beispiel 17

45 Herstellung des NTA-Harzes

41,7 g Bromessigsäure wurden in 150 ml 2N Natronlauge gelöst und auf 0°C gekühlt. Dazu wurde unter Rühren eine Lösung von 42 g N^ε-Z-L-Lysin in 225 ml 2N Natronlauge bei 0°C langsam zugetropft. Nach 2 Stunden wurde die Kühlung abgestellt und über Nacht weitergerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch während 2 Stunden bei 50°C gehalten und anschliessend wurden 450 ml 1N Salzsäure zugesetzt. Nachdem das Gemisch abgekühlt war wurden die ausgeschiedenen Kristalle abfiltriert. Das Produkt wurde in 1N Natronlauge gelöst und mit der gleichen Menge 1N Salzsäure erneut gefällt und abfiltriert. Es wurden 40 g N-[5-Benzoyloxycarbonylamino-1-carboxypentyl]-iminodiessigsäure in Form weisser Kristalle, Smp. 172-174°C (Zers.), $[\alpha]_D = +9,9^\circ$ (c = 1; 0,1 N NaOH), erhalten.

55

7,9 g des erhaltenen Lysinderivats wurden in 49 ml 1N Natronlauge gelöst und nach Zusatz einer Spatelspitze 5% Pd/C bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Es resultierten 6,2 g N-[5-Amino-1-carboxypentyl]-iminodiessigsäure, deren Struktur, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{COOH})-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$, durch das NMR-Spektrum bestätigt wurde.

100 ml Sepharose® CL-6B (Pharmacia) wurden auf einer Glasfilternutsche zweimal mit ca. 500 ml Wasser gewaschen und dann in einem 500 ml Rundkolben mit 16 ml 4N Natronlauge und 8,22 ml Epibromhydrin 4 Stunden bei 30 °C umgesetzt. Das Totalvolumen des Reaktionsgemisches war 200 ml. Anschliessend wurde die aktivierte Sepharose abfiltriert, mit Wasser neutral gewaschen und zurück in das Reaktionsgefäss transferiert. 6,5 g N-[5-Amino-1-carboxypentyl]-iminodiessigsäure wurden in 50 ml Wasser gelöst und zusammen mit 10,6 g festem Soda zur aktivierten Sepharose gegeben. Das Gemisch wurde bei 60 °C über Nacht langsam gerührt. Das resultierende Chelatharz mit der Formel [Sepharose® CL-6B]-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-(CH₂)₄-CH(COOH)-N(CH₂COOH)₂ (NTA-Harz) wurde anschliessend in einer Chromatographiesäule nacheinander mit 500 ml Wasser, 100 ml wässrigem NiSO₄·6H₂O (2 Gew.-%), 200 ml Wasser, 200 ml 0,2M Essigsäure (enthaltend 0,2M NaCl und 0,1 Gew./Vol.% Tween 20) und 200 ml Wasser gewaschen. Die Nickelionenkonzentration des resultierenden Chelatharzes der Formel [Sepharose® CL-6B]-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-(CH₂)₄-CH(COOH)-N(CH₂COO⁻)₂ Ni²⁺ betrug etwa 7,1 Mikromol/ml.

Beispiel 18

Metallchelat Affinitäts-Chromatographie mit gereinigtem IFN-γ

Eine Säule (Ø 1,6 cm, Länge = 7,0 cm) wurde mit metallfreiem Chelatharz der Formel [Sepharose® CL-6B]-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-(CH₂)₄-CH(COOH)-N(CH₂COOH)₂ (NTA-Harz) gefüllt und das Harz durch Spülen mit dem dreifachen Säulenvolumen 0,1M NiSO₄·5H₂O und anschliessendes Waschen mit dem dreifachen Säulenvolumen 0,2M Essigsäure in die Nickelform gebracht. Anschliessend wurde mit 0,1M Tris·HCl Puffer (pH 7,5) und 0,5M NaCl äquilibriert (Durchfluss jeweils 60 ml/Std.).

1 mg gereinigtes IFN-γ (Beisp. 3, Aminosäuresequenz siehe Abb.40) wurde in 3 ml Äquilibrierungspuffer aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Mittels Enzymimmunoassay [Gallati, H., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 907-914 (1982)] konnte nachgewiesen werden, dass trotz der beiden proteininternen Strukturelemente Gly-His-Ser und Ile-His-Glu keine Bindung an der NTA-Säule erfolgte.

Beispiel 19

Reinigung von His₂-His-Xa-IFN-γ mittels NTA-Harz

E. coli M15 Zellen, enthaltend die Plasmide pDML1 und pHis₂-His-Xa-IFN-γ (Beisp. 6), wurden in 1 Liter LB-Medium, enthaltend 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin, bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,6 wachsen gelassen. Dann wurde IPTG hinzugegeben (Endkonzentration 0,5mM) und die Zellen wurden für weitere 4 Stunden inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 x g, 10 min, 4 °C) vom Kulturmedium abgetrennt (5 g Nassgewicht) und mit 15 ml 7M Guanidin·HCl und 0,01M Natriumborat (pH 8) aufgeschlossen (1 Std, 4 °C, Magnetrührer). Der so gewonnene Rohextrakt wurde zentrifugiert (10'000 x g, 15', 4 °C), der Überstand 10-fach mit 0,1M Tris·HCl Puffer (pH 7,5) und 0,5M NaCl verdünnt, abermals zentrifugiert (10'000 x g, 15', 4 °C) und auf die gleiche, wie in Beispiel 18 beschriebene NTA-Säule aufgepumpt. Anschliessend wurde die Säule mit Äquilibrierungspuffer so lange gewaschen, bis der UV-Detektor (280 nm) wieder den Basiswert anzeigte. Die Elution des His₂-His-Xa-IFN-γ erfolgte durch Senken des pH-Wertes auf 5,5. Mittels Enzymimmunoassay [Gallati, H., supra] konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein quantitativ von der NTA-Säule absorbiert wurde und erst durch Senken des pH-Wertes eluiert wurde. Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und RP-18 HPLC konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem erhaltenen Protein um reines His₂-His-IFN-γ (Reinheit > 90%) handelte. Die erwartete aminoterminal Sequenz Met-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg-Gln... wurde durch Edman-Abbau bestätigt.

Beispiel 20

Reinigung von His₂-His-Ek-IFN-γ(-8) mittels NTA-Harz

His₂-His-Ek-IFN-γ(-8) (Beisp.7) wurde in zu Beispiel 19 analoger Weise in E. coli exprimiert, extrahiert und über die NTA-Säule gereinigt. Dieses Fusionsprotein wurde ebenfalls bei pH 7,5 an die NTA-Säule gebunden und durch Senkung des pH-Wertes auf 5,5 in reiner Form eluiert (Reinheit > 90%). Die erwartete Sequenz Met-His-His-Ala-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Gln... wurde durch Edman-Abbau bestätigt.

Beispiel 21Reinigung von His-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) mittels NTA-Harz

5 His-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) (Beisp. 8) wurde in zu Beispiel 19 analoger Weise in *E. coli* exprimiert, extrahiert und über die NTA-Säule gereinigt. Dieses Protein wurde ebenfalls bei pH 7,5 an die NTA-Säule gebunden und durch Senkung des pH-Wertes auf 5,5 in reiner Form eluiert (Reinheit > 90%).

1 mg des so erhaltenen His-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) wurde gegen 0,1M Tris-HCl (pH 7,5), 0,5M NaCl und 1mM CaCl₂ dialysiert. Das Dialysat (5 ml) wurde mit 100 μ l (= 1U) Gerinnungsfaktor Xa versetzt
 10 (Boehringer/Mannheim) und für 16 Stunden bei 22°C inkubiert. Der enzymatische Abbau des His-His-Affinitätspeptids wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachgewiesen.

Zwecks Abtrennung von Salzen, Rinderserumalbumin (Bestandteil des käuflichen Faktor Xa Präparates) und Faktor Xa wurde die Inkubationsmischung zuerst gegen Wasser dialysiert, dann lyophilisiert und anschliessend an einer RP-18 HPLC-Säule (Nucleosil 5C18 Säule von Brownlee Labs, Fließmittel 0,1% Trifluoressigsäure, Gradient mit Acetonitril, Durchfluss 1 ml/min) chromatographiert. Das resultierende
 15 gereinigte Protein wurde dann vom Lösungsmittel befreit und einem Edman-Abbau unterworfen. Mittels dieser Methode konnte die erwartete aminoterminal Sequenz Gln-Asn-Pro-Tyr..... bestätigt werden.

Dieses Experiment zeigt, dass die Affinitätssequenz am NH₂-Terminus des His-His-Xa-IFN- γ (-8)(Asn) nach der Metallchelate-Affinitätschromatographie sauber abgespalten werden kann.

Beispiel 22Reinigung von (His)₆-mDHFR mittels NTA-Harz in 6M Guanidin-HCl

25 (His)₆-mDHFR (Beispiel 9) wurde in zu Beispiel 19 analoger Weise in *E. coli* exprimiert. Die Zellen wurden mit 6M Guanidin-HCl in 0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) aufgeschlossen (5 ml Pufferlösung pro 1 g Zellen, 1 Std., 22°C, Magnetrührer). Der so gewonnene Rohextrakt wurde anschliessend zentrifugiert und der Ueberstand auf die gleiche, wie in Beispiel 18 beschriebene NTA-Säule aufgepumpt. Mit Ausnahme der verwendet Pufferlösungen wurde die Chromatographie analog zu Beispiel 19 durchgeführt.

30 Die verwendeten Puffer enthielten jeweils 6M Guanidin-HCl in 0,1M Natriumphosphatpuffer mit den folgenden pH-Werten: pH 8,0 zum Auftragen der Proteine, pH 6,0 zum Auswaschen der nicht gebundenen *E. coli*-Proteine und pH 4,5 zur Elution des (His)₆-mDHFR. Das erhaltene Eluat wurde gegen Wasser dialysiert und anschliessend lyophilisiert. Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem erhaltenen Protein um reines (His)₆-mDHFR (Reinheit >90%) handelte. Die erwartete Sequenz Met-Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His-His-Gly-Ser-Ile-Met... wurde durch Edmann-Abbau
 35 bestätigt.

Beispiel 23Reinigung von (His)₆-mDHFR-(His)₆ mittels NTA-Harz in 6M Guanidin-HCl

(His)₆-mDHFR-(His)₆ (Beispiel 16) wurde in zu Beispiel 19 analoger Weise in *E. coli* exprimiert, extrahiert und über die NTA-Säule gereinigt. Anstelle des in Beispiel 22 verwendeten Stufengradienten wurde ein linearer pH-Gradient (pH 8,0 bis pH 4,0, 2 Stunden) zur Elution verwendet. (His)₆-mDHFR-(His)₆-
 45 Fusionsprotein wurde bei pH 4,9 eluiert und wies eine Reinheit von mindestens 90% auf.

Beispiel 24Reinigung von Met-mDHFR-(His)₆ mittels NTA-Harz in 6M Harnstoff

50 Met-mDHFR-(His)₆ (Beispiel 14) wurde in zu Beispiel 19 analoger Weise in *E. coli* exprimiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit 6M Harnstoff in 0,05M Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) (1 g Zellen pro 10 ml Pufferlösung) und Ultraschall (10 Minuten) extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Ueberstand auf eine mit Extraktionspuffer äquilibrierte NTA-Säule (4,5 cm x 2,6 cm) aufgetragen.

55 Nach dem Waschen der Säule mit Extraktionspuffer wurde das Met-mDHFR-(His)₆-Fusionsprotein mit einem linearen pH-Gradienten von pH 7,5 (Extraktionspuffer) bis pH 4,8 (0,05M Natriumphosphatpuffer enthaltend 6M Harnstoff) während 5 Stunden und einer Pumpgeschwindigkeit von 18 ml pro Stunde eluiert. Die Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Es

wurden 9 mg Met-mDHFR-(His)₆-Fusionsprotein mit einer Reinheit >90% erhalten.

Beispiel 25

5 Reinigung von Met-mDHFR-(His)₂ mittels NTA-Harz

Met-mDHFR-(His)₂ (Beispiel 15) wurde in zu Beispiel 19 analoger Weise in E. coli exprimiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 0,05M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0), enthaltend 0,1M Kaliumchlorid und 0,1% Tween 20, während 15 Minuten im Eisbad mit Ultraschall behandelt (1 g Zellen pro 10 ml Pufferlösung). Anschliessend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der klare Ueberstand auf eine mit Extraktionspuffer äquilibrierte NTA-Säule (4,6 cm x 2,6 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Extraktionspuffer gewaschen und das Met-mDHFR-(His)₂-Fusionsprotein mit einem linearen pH-Gradienten von pH 8,0 (Extraktionspuffer) bis pH 5,0 (0,05M Kaliumphosphatpuffer enthaltend 0,1M Kaliumchlorid und 0,1% Tween 20) während 10 Stunden und einer Pumpgeschwindigkeit von 50 ml pro Stunde eluiert. Die Gipfel-
10 Fraktionen des Eluates wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Es wurden 7 mg Met-mDHFR-(His)₂-Fusionsprotein mit einer Reinheit von >85% erhalten.

3 mg des so erhaltenen Fusionsproteins Met-mDHFR-(His)₂ wurden gegen 0,05M Tris-HCl (pH 6,0) bei 6°C dialysiert. Die Proteinlösung wurde dann mit 0,5M NaOH auf pH 9,0 eingestellt und bei 37°C in Gegenwart von 8,5 Einheiten Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
20 BRD) inkubiert. Nach 0, 15, 30, 90 und 180 Minuten wurden Proben entnommen und mittels HPLC auf ihren Histidingehalt analysiert. Nach 480 Minuten wurde der pH-Wert auf 8,0 abgesenkt und das Reaktionsgemisch auf eine, mit 0,05M Kaliumphosphatpuffer (pH 8) äquilibrierte NTA-Säule gepumpt. Das im Reaktionsgemisch enthaltene Protein wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im Durchfluss nachgewiesen. Zusätzlich wurde in den Proben, welche nach 15, 30, 90 und 180 Minuten aus der Proteinlösung
25 entnommen worden waren, eine mit der Zeit zunehmende Menge von Histidinresten nachgewiesen.

Dieses Experiment zeigt, dass die Affinitätssequenz am Carboxyterminus nach der Reinigung am NTA-Harz sauber entfernt werden kann.

Patentansprüche

- 30 1. Fusionsproteine bestehend aus einem oder zwei Affinitätsseptiden, welche mindestens zwei direkt nebeneinander stehende Histidinreste enthalten und eine hohe Affinität für einen Liganden haben, und einem an diese Affinitätspeptide direkt oder indirekt gebundenen biologisch aktiven Polypeptid oder Protein.
- 35 2. Fusionsproteine gemäss Anspruch 1, worin die Affinitätspeptide die Formel

$$R^1-(His)_2-R^2$$
 aufweisen,
 40 worin R¹ Wasserstoff, eine Aminosäure oder eine Sequenz von mehreren Aminosäuren ist, R² Q, Q-Ile-Glu-Gly-Arg- oder Q-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- darstellt und Q eine Peptidbindung, eine Aminosäure oder eine Sequenz von mehreren, max. 30 Aminosäuren ist.
- 45 3. Fusionsproteine gemäss Anspruch 1 oder 2, worin die Affinitätspeptide eine Peptidsequenz der Formeln

50

55

Met-His-His,

Met-His-His-His,

5 Met-His-His-His-His,

Met-His-His-His-His-His,

Met-His-His-His-His-His-His,

10 Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg

oder Met-His-His-Ala-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys

aufweisen.

15

4. Fusionsproteine gemäss einem der Ansprüche 1-3, worin ein Affinitätspeptid direkt oder indirekt an die aminoterminalen oder die carboxyterminalen Aminosäure des biologisch aktiven Polypeptids oder Proteins gebunden ist.

20

5. Fusionsproteine gemäss einem der Ansprüche 1-3, worin ein Affinitätspeptid direkt oder indirekt an die aminoterminalen Aminosäure und ein weiteres an die carboxyterminalen Aminosäure des biologisch aktiven Polypeptids oder Proteins gebunden ist.

25

6. Fusionsproteine gemäss einem der Ansprüche 1-5, worin die Affinitätspeptide immobilisierte Nickelionen komplexieren.

30

7. Fusionsproteine gemäss einem der Ansprüche 1-6, worin das biologisch aktive Polypeptid oder Protein die Aminosäuresequenz eines Human-Immun-Interferons oder Teilsequenzen davon oder die Aminosäuresequenz der Dihydrofolatreduktase der Maus aufweist.

8. Ein bakteriell hergestelltes Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-7.

9. Ein durch E. coli hergestelltes Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-7.

35

10. Ein Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-9 in homogener Form.

11. Gene, die für ein Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-9 kodieren.

40

12. Expressionsvektoren, in denen ein Gen gemäss Anspruch 11 operativ an eine Expressionskontrollsequenz gebunden ist.

13. Expressionsvektoren gemäss Anspruch 12, die in einem gram-negativen Bakterium replizieren können.

14. Expressionsvektoren gemäss Anspruch 13, die in E. coli replizieren können.

45

15. Mit einem Expressionsvektor gemäss den Ansprüchen 12-14 transformiertes Bakterium.

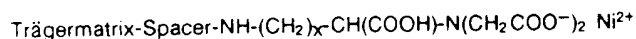
16. Mit einem Expressionsvektor gemäss den Ansprüchen 12-14 transformierter E. coli Stamm.

50

17. Mit einem Expressionsvektor gemäss den Ansprüchen 12-14 transformierter E. coli M15 Stamm.

18. Verfahren zur Reinigung eines Fusionsproteins gemäss einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung enthaltend genanntes Fusionsprotein mit einem Metalchelatharz folgender Struktur

55



worin X 2, 3 oder 4 bedeutet.

in Kontakt bringt und das genannte Fusionsprotein durch Behandlung des beladenen Harzes mit einer Waschflüssigkeit eluiert.

- 5 19. Verfahren gemäss Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Trägermatrix um Sepharose® CL-6B handelt.
20. Verfahren gemäss Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer -O-CO- oder -O-CH₂-CH(OH)-CH₂- ist.
- 10 21. Verfahren zur Reinigung eines biologisch aktiven Polypeptids oder Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass man es als Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-9 mittels eines Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 18-20 reinigt und dann durch selektive Abspaltung das Affinitätspeptid entfernt.
- 15 22. Verfahren gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass zur Abspaltung des Affinitätspeptids eine Protease verwendet wird.
23. Verfahren gemäss Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Protease um den Faktor Xa handelt.
- 20 24. Impfstoffe enthaltend ein Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-10 und ein physiologisch verträgliches Trägermaterial.
- 25 25. Reagenzien zur Bestimmung von Infektionskrankheiten enthaltend ein Fusionsprotein gemäss einem der Ansprüche 1-10.
26. Verwendung eines Fusionsproteins gemäss einem der Ansprüche 1-9 zur Reinigung eines biologisch aktiven Polypeptids mittels eines Verfahrens gemäss einem der Ansprüche 21-23.
- 30 27. Expressionsvektoren, in denen eine Nukleotidsequenz, die für ein Affinitätspeptid gemäss Anspruch 3 kodiert, operativ an eine Expressionskontrollsequenz gebunden ist.

Claims

- 35 1. Fusion proteins consisting of one or two affinity peptides, which contain at least two directly neighbouring histidine residues and which have high affinity for a ligand, and a biologically active polypeptide or protein linked directly or indirectly to this/these affinity peptide(s).
2. Fusion proteins in accordance with claim 1, wherein the affinity peptide has the formula
- 40
$$R^1-(\text{His})_2-4-R^2$$

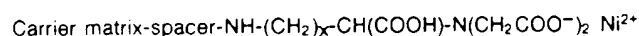
wherein R¹ represents hydrogen, an amino acid or a sequence of several amino acids, R² represents Q, Q-Ile-Glu-Gly-Arg-or Q-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- and Q is a peptide bond, an amino acid or a sequence of several, max. 30, amino acids.
- 45 3. Fusion proteins in accordance with claim 1 or 2, wherein in the affinity peptide has a peptide sequence of the formula

50

55

Met-His-His
 Met-His-His-His
 5 Met-His-His-His-His
 Met-His-His-His-His-His
 Met-His-His-His-His-His-His
 10 Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg
 or Met-His-His-Ala-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys.

- 15 4. Fusion proteins in accordance with any one of claims 1-3, wherein one affinity peptide is linked directly or indirectly to the amino terminal or the carboxy terminal amino acid of the biologically active polypeptide or protein.
- 20 5. Fusion proteins in accordance with any one of claims 1-3, wherein one affinity peptide is linked directly or indirectly to the amino terminal amino acid of the biologically active polypeptide or protein and a further affinity peptide is linked to the carboxy terminal amino acid of the biologically active polypeptide or protein.
- 25 6. Fusion proteins in accordance with any one of claims 1-5, wherein the affinity peptides complex immobilized nickel ions.
7. Fusion proteins in accordance with any one of claims 1-6, wherein the biologically active polypeptide or protein has the amino acid sequence of a human immune interferon or partial sequences thereof or the amino acid sequence of mouse dihydrofolate reductase.
- 30 8. A bacterially prepared fusion protein in accordance with any one of claims 1-7.
9. A fusion protein in accordance with any one of claims 1-7 prepared by *E. coli*.
- 35 10. A fusion protein in accordance with any one of claims 1-9 in homogeneous form.
11. Genes which code for a fusion protein in accordance with any one claims 1-9.
- 40 12. Expression vectors in which a gene in accordance with claim 11 is operatively linked to an expression control sequence.
13. Expression vectors in accordance with claim 12 which can replicate in a gram-negative bacterium.
14. Expression vectors in accordance with claim 13 which can replicate in *E. coli*.
- 45 15. A bacterium transformed with an expression vector in accordance with claims 12-14.
16. An *E. coli* strain transformed with an expression vector in accordance with claims 12-14.
- 50 17. *E. coli* M15 strain transformed with an expression vector in accordance with claims 12-14.
18. A process for the purification of a fusion protein in accordance with any one of claims 1-9, characterized by bringing a solution containing the said fusion protein into contact with a metal chelate resin of the following structure



wherein X signifies 2, 3 or 4,

and eluting the said fusion protein by treating the loaded resin with a wash liquid.

19. A process in accordance with claim 18, wherein the carrier matrix is Sepharose® CL-6B.
- 5 20. A process in accordance with claim 18 or 19, wherein the spacer is -O-CO-or -O-CH₂-CH(OH)-CH₂-.
21. A process for the purification of a biologically active polypeptide or protein, characterized by purifying it as a fusion protein in accordance with any one of claims 1-9 by means of a process in accordance with any one of claims 18-20 and then removing the affinity peptide by selective cleavage
- 10 22. A process in accordance with claim 21, characterized in that a protease is used for the cleavage of the affinity peptide.
23. A process in accordance with claim 22, characterized in that the protease is factor Xa.
- 15 24. Vaccines containing a fusion protein in accordance with any one of claims 1-10 and a physiologically compatible carrier material.
- 25 25. Reagents for the determination of infectious diseases, containing a fusion protein in accordance with any one of claims 1-10.
26. The use of a fusion protein in accordance with any one of claims 1-9 for the purification of a biologically active polypeptide by means of a process in accordance with any one of claims 21-23.
27. Expression vectors in which a nucleotide sequence which codes for an affinity peptide in accordance with claim 3 is operatively linked to an expression control sequence.

Revendications

- 30 1. Protéines fusionnées consistant en un ou deux peptides d'affinité, qui contiennent au moins deux restes histidine directement vicinaux et ont une affinité élevée pour un ligand, et en un polypeptide ou une protéine biologiquement actif, lié directement ou indirectement à ces peptides d'affinité.
2. Protéines fusionnées selon la revendication 1, dans lesquelles les peptides d'affinité répondent à la formule
- 35 $R^1 - (His)_2 - R^2$
- où R¹ est l'hydrogène, un acide aminé ou une séquence de plusieurs acides aminés, R² représente Q, Q-Ile-Glu-Gly-Arg- ou Q-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- et Q est une liaison peptidique, un acide aminé ou une séquence de plusieurs, au maximum 30, acides aminés.
- 40 3. Protéines fusionnées selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lesquelles les peptides d'affinité présentent une séquence peptidique répondant aux formules

45

Met-His-His,

Met-His-His-His,

50

Met-His-His-His-His,

Met-His-His-His-His-His,

Met-His-His-His-His-His-His,

55

Met-His-His-Ala-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg

ou

Met-His-His-Ala-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys.

4. Protéines fusionnées selon l'une quelconque des revendications 1-3, dans lesquelles un peptide d'affinité est lié directement ou indirectement à l'acide aminé aminoterminal ou à l'acide aminé carboxyterminal du polypeptide ou de la protéine biologiquement actif.
- 5 5. Protéines fusionnées selon l'une quelconque des revendications 1-3, dans lesquelles un peptide d'affinité est lié directement ou indirectement à l'acide aminé aminoterminal et un autre à l'acide aminé carboxyterminal du polypeptide ou de la protéine biologiquement actif.
6. Protéines fusionnées selon l'une quelconque des revendications 1-5, dans lesquelles les peptides d'affinité complexent des ions nickel immobilisés.
- 10 7. Protéines fusionnées selon l'une quelconque des revendications 1-6, dans lesquelles le polypeptide ou la protéine biologiquement actif présente la séquence d'acides aminés d'un interféron immunitaire humain ou des séquences partielles de celui-ci ou la séquence d'acides aminés de la dihydrofolate-réductase de souris.
- 15 8. Protéine fusionnée préparée par voie bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1-7.
9. Protéine fusionnée préparée au moyen d'E. coli selon l'une quelconque des revendications 1-7.
- 20 10. Protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-9 sous une forme homogène.
11. Gènes, qui codent pour une protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-9.
- 25 12. Vecteurs d'expression, dans lesquels un gène selon la revendication 11 est lié de façon opérationnelle à une séquence de régulation d'expression.
13. Vecteurs d'expression selon la revendication 12, qui peuvent se répliquer dans une bactérie Gram négative.
- 30 14. Vecteurs d'expression selon la revendication 13, qui peuvent se répliquer dans E. coli.
15. Bactérie transformée avec un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 12-14.
- 35 16. Souche d'E. coli transformée avec un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 12-14.
17. Souche M15 d'E. coli transformée avec un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 12-14.
- 40 18. Procédé pour la purification d'une protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-9, caractérisée en ce qu'on met en contact une solution contenant ladite protéine fusionnée avec une résine de chélate de métal ayant la structure suivante
- 45
$$\text{matrice support-espaceur-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-CH(COOH)-N(CH}_2\text{COO}^-\text{)}_2 \text{ Ni}^{2+}$$

où X est le nombre 2, 3 ou 4,
et on élue la protéine fusionnée susdite par traitement de la résine chargée avec un fluide de lavage.
- 50 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il s'agit pour la matrice support de Sepharose® CL-6B.
20. Procédé selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que l'espaceur est -O-CO- ou -O-CH₂-CH(OH)-CH₂-.
- 55 21. Procédé pour la purification d'un polypeptide ou d'une protéine biologiquement actif, caractérisé en ce qu'on le purifie sous forme de protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-9 au moyen d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 18-20 et ensuite on élimine le peptide

d'affinité par séparation sélective.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'on utilise une protéase pour la séparation du peptide d'affinité.
- 5 23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il s'agit, en ce qui concerne la protéase, du facteur Xa.
24. Substances inoculantes contenant une protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-10 et une matière support physiologiquement acceptable.
- 10 25. Réactifs pour la détermination de maladies infectieuses contenant une protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-10.
- 15 26. Utilisation d'une protéine fusionnée selon l'une quelconque des revendications 1-9 pour la purification d'un polypeptide biologiquement actif au moyen d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 21-23.
- 20 27. Vecteurs d'expression, dans lesquels une séquence nucléotidique, qui code pour un peptide d'affinité selon la revendication 3, est lié de façon opérationnelle à une séquence de régulation d'expression.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

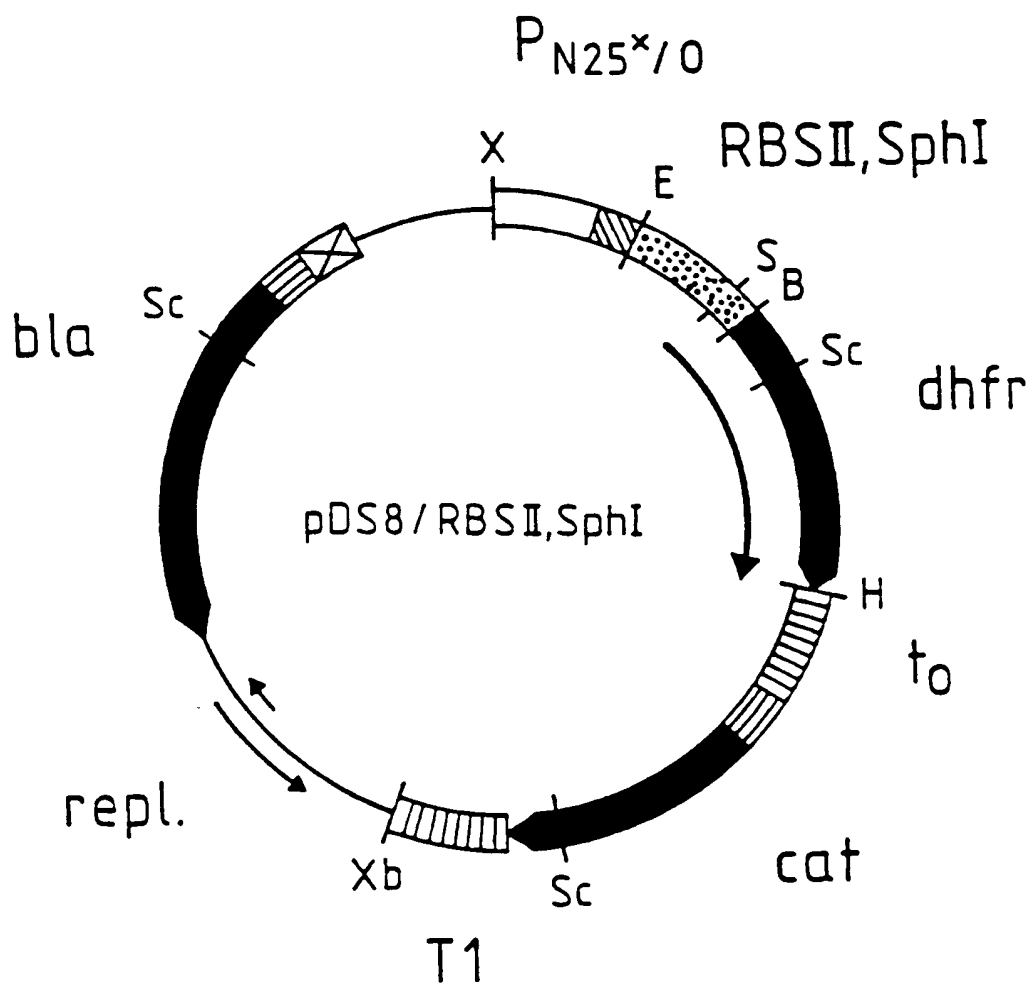


Abbildung 2

	10	20	30	40	50
0	<u>CCTCGAGGCT</u>	GGCATCCCTA	ACATATCCGA	ATGGTTACTT	AAACAACGGA
50	GGA	CTAGCGT	ATCCCTTCGC	ATAGGGTTTG	AGTTAGATAA
100	GA	ACTTTTCTT	CTTTGCTCAA	AGAATCATAA	AAAAATTTATT
150	AAA	ATTTTTC	TGTATAATAG	ATTCAAATTG	TGAGCGGATA
200	TT	CATTAAAG	AGGAGAAATT	<u>AAGCATGCGA</u>	<u>GGATCCGGCA</u>
250	ACC	ATTGAAC	TGCATCGTCG	CCGTGTCCCA	AAATATGGGG
300	AC	GGAGACCT	ACCCTGGCCT	CCGCTCAGGA	ACGAGTTCAA
350	AGA	ATGACCA	CAACCTCTTC	AGTGGAAGGT	AAACAGAATC
400	GGG	TAGGAAA	ACCTGGTTCT	CCATTCCCTGA	GAAGAATCGA
450	AC	AGAATTAA	TATAGTTCTC	AGTAGAGAAC	TCAAAGAACC
500	GCT	CATTTTC	TTGCCAAAAG	TTTGGATGAT	GCCTTAAGAC
550	ACC	GGAATTG	GCAAGTAAAG	TAGACATGGT	TTGGATAGTC
600	CTG	TTTACCA	GGAAAGCCATG	AATCAACCAG	GCCACCTTAG
650	ACA	AGGATCA	TGCAGGAATT	TGAAAGTGAC	ACGTTTTTCC
700	TTT	GGGGAAA	TATAAACTTC	TCCCAGAATA	CCCAGGCGTC
750	TCC	AGGAGGA	AAAAGGCATC	AAGTATAAGT	TTGAAGTCTA
800	GAC	TAAACAGG	AAGATGCTTT	CAAGTTCTCT	GCTCCCCTCC
850	CAT	TTTTTATA	AGACCATGGG	ACTTTTGCTG	GCTTTAGATC
900	TGG	ACTCCTG	TTGATAGATC	CAGTAATGAC	CTCAGAACTC
950	TG	TCAGAAC	GCTCGGTTGC	CGCCGGGCGT	TTTTTATTGG
1000	AG	CTAGCTTG	GCGAGATTTT	CAGGAGCTAA	GGAAGCTAAA
1050	AA	ATCACTGG	ATATACCACC	GTTGATATAT	CCCAATGGCA
1100	CAT	TTTGAGG	CATTTAGTC	AGTTGCTCAA	TGTACCTATA
1150	TC	AGCTGGAT	ATTACGGCCT	TTTTAAAGAC	CGTAAAGAAA

Abbildung 2 (Fortsetzung)

	10	20	30	40	50
1200	AGTTTTATCC	GGCCTTTATT	CACATTCTTG	CCCGCCTGAT	GAATGCTCAT
1250	CCGGAATTTT	GTATGGCAAT	GAAAGACGGT	GAGCTGGTGA	TATGGGATAG
1300	TGTTACCCCT	TGTTACACCG	TTTTCCATGA	GCAAAGTGA	ACGTTTTTCAT
1350	CGCTCTGGAG	TGAATACCAC	GACGATTTC	GGCAGTTTCT	ACACATATAT
1400	TCGCAAGATG	TGGCGTGTTA	CGGTGAAAAC	CTGGCCTATT	TCCCTAAAGG
1450	GTTTATTGAG	AATATGTTTT	TCGTCTCAGC	CAATCCCTGG	GTGAGTTTCA
1500	CCAGTTTTGA	TTTAAACGTG	GCCAATATGG	ACAACTTCTT	CGCCCCCGTT
1550	TTCACCATGG	GCAAATATTA	TACGCAAGGC	GACAAGGTGC	TGATGCCCGCT
1600	GGCGATTGAG	GTTTCATCATG	CCGTCTGTGA	TGGCTTCCAT	GTGCGCAGAA
1650	TGCTTAATGA	ATTACAACAG	TACTGCCGATG	AGTGGCAGGG	CGGGGCGTAA
1700	TTTTTTTAAG	GCAGTTATTG	GTGCCCTTAA	ACGCCTGGGG	TAATGACTCT
1750	CTAGCTTGAG	GCATCAAATA	AAACGAAAGG	CTCAGTCGAA	AGACTGGGCC
1800	TTTCGTTTTA	TCTGTTGTTT	GTCCGTGAAC	GCTCTCCTGA	GTAGGACAAA
1850	TCCGCCGCTC	TAGAGC	_____		

|
2068

—————pBR322—————A
|
4358

Abbildung 3

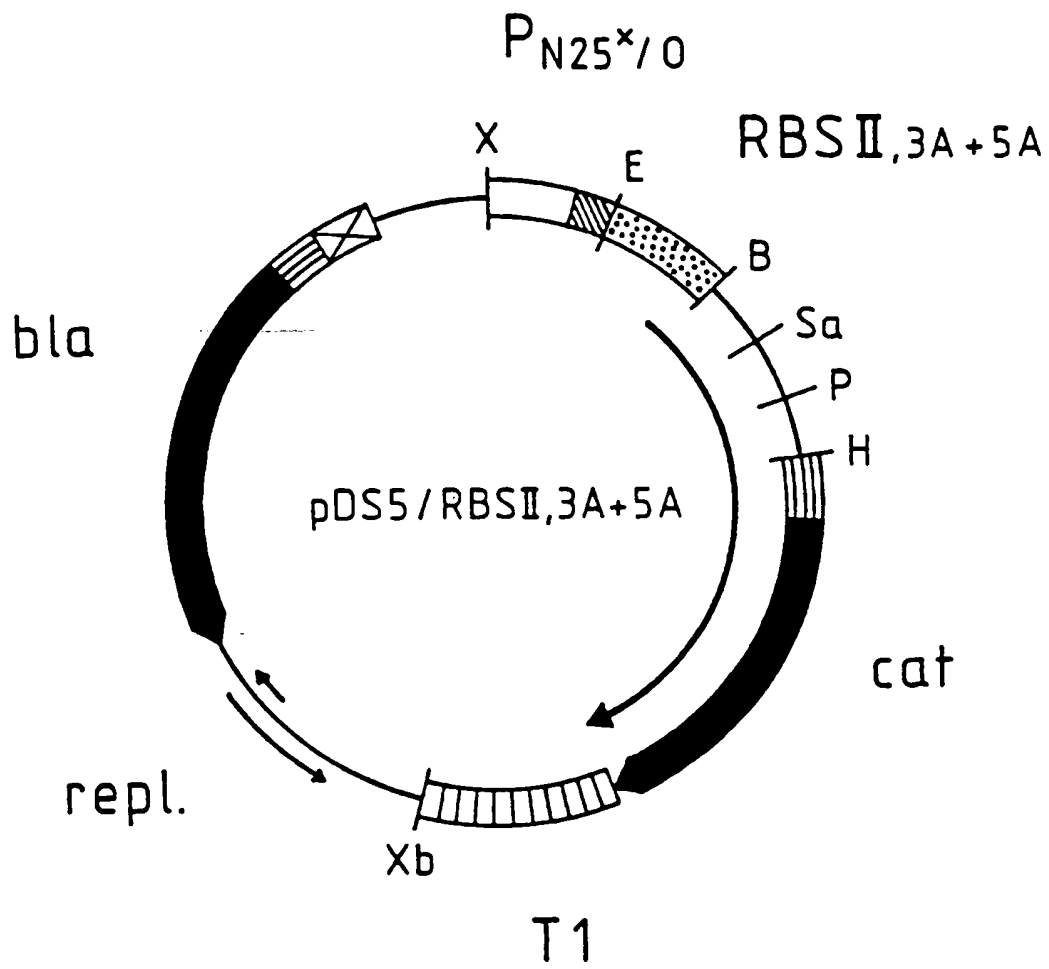


Abbildung 4

	10	20	30	40	50
0	<u>CCTCGAGGCT</u>	GGCATCCCTA	ACATATCCGA	ATGGTTACTT	AAACAACGGA
50	GGACTAGCGT	<u>ATCCCTTCGC</u>	ATAGGGTTTG	AGTTAGATAA	AGTATATGCT
100	GAACTTTCTT	CTTTGCTCAA	AGAATCATAA	AAAATTTATT	<u>TGCTTTCAGG</u>
150	AAAATTTTTC	TGTATAATAG	ATTCAAATTG	TGAGCGGATA	<u>ACAATTTGAA</u>
200	<u>TTCATTAAAG</u>	AGGAGAAATT	AAC <u>TATGAGG</u>	<u>GGATCCGTCG</u>	<u>ACCTGCAGCC</u>
250	<u>AAGCTTGGCG</u>	AGATTTTCAG	GAGCTAAGGA	AGCTAAAAATG	GAGAAAAAAA
300	<u>TCACTGGATA</u>	TACCACCGTT	GATATATCCC	AATGGCATCG	TAAAGAACAT
350	<u>TTTGAGGCAT</u>	<u>TTCAGTCAGT</u>	TGCTCAATGT	<u>ACCTATAACC</u>	<u>AGACCGTTCA</u>
400	<u>GCTGGATATT</u>	ACGGCCTTTT	TAAAGACCGT	AAAGAAAAAT	<u>AAGCACAAGT</u>
450	<u>TTTATCCGGC</u>	<u>CTTTATTAC</u>	<u>ATTCTTGCCC</u>	GCCTGATGAA	<u>TGCTCATCCG</u>
500	<u>GAATTTTCGT</u>	TGGCAATGAA	AGACGGTGAG	CTGGTGATAT	<u>GGGATAGTGT</u>
550	<u>TCACCCTTGT</u>	TACACCGTTT	TCCATGAGCA	AACTGAAACG	<u>TTTTCATCCG</u>
600	<u>TCTGGAGTGA</u>	ATACCACGAC	GATTTCCGGC	AGTTTCTACA	<u>CATATATTCC</u>
650	<u>CAAGATGTGG</u>	<u>CGTGTTACGG</u>	TGAAAACCTG	GCCTATTTCC	<u>CTAAAGGGTT</u>
700	<u>TATTGAGAAT</u>	<u>ATGTTTTTCG</u>	TCTCAGCCAA	<u>TCCCTGGGTG</u>	<u>AGTTTCACCA</u>
750	<u>GTTTTGATTT</u>	AAACGTGGCC	AATATGGACA	<u>ACTTCTTCGC</u>	<u>CCCCGTTTTC</u>
800	<u>ACCATGGGCA</u>	AATATTATAC	GCAAGGCGAC	AAGTGCTGA	<u>TGCCGCTGGC</u>
850	<u>GATTCAGGTT</u>	CATCATGCCG	TCTGTGATGG	<u>CTTCCATGTC</u>	<u>GGCAGAATGC</u>
900	<u>TTAATGAATT</u>	ACAACAGTAC	TGCGATGAGT	GGCAGGGCGG	<u>GGCGTAATTT</u>
950	TTTTAAGGCA	GTTATTGGTG	CCCTTAAACG	CCTGGGGTAA	TGACTCTCTA
1000	GCTTGAGGCA	TCAAATAAAA	CGAAAGGCTC	AGTCGAAAGA	CTGGGCCTTT
1050	CGTTTTATCT	GTTGTTTGTC	GGTGAACGCT	CTCCTGAGTA	GGACAAATCC
1100	<u>GCCGCTCTAG</u>	<u>AGCTGCCTCG</u>	CGCGTTTCGG	TGATGACGGT	GAAAACCTCT
1150	GACACATGCA	GCTCCCGGAG	ACGGTCACAG	CTTGTCTGTA	AGCGGATGCC

Abbildung 4 (Fortsetzung)

	10	20	30	40	50
1200	GGGAGCAGAC	AAGCCCCGTCA	GGGCGCGCTCA	GCGGGTGTTG	GCGGGTGTCG
1250	GGGCGCAGCC	ATGACCCAGT	CACGTAGCGA	TAGCGGAGTG	TATACTGGCT
1300	TAACTATGCG	GCATCAGAGC	AGATTGTACT	GAGAGTGCAC	CATATGCGGT
1350	GTGAAATACC	GCACAGATGC	GTAAGGAGAA	AATACCGCAT	CAGGCGCTCT
1400	TCCGCTTCCT	CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC	TCCGTCTGTC	GGCTGCGGCG
1450	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC	ACAGAATCAG
1500	GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG
1550	AACCGTAAAA	AGGCCGCGTT	GCTGGCGTTT	TTCCATAGGC	TCCGCCCCCC
1600	TGACGAGCAT	CACAAAAATC	GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCCGA
1650	CAGGACTATA	AAGATACCAg	GCGTTTCCCC	CTGGAAGCTC	CCTCGTGCGC
1700	TCTCCTGTTT	CGACCCCTGCC	GCTTACCGGA	TACCTGTCCG	CCTTTCTCCC
1750	TTGCGGAAGC	GTGGCGCTTT	CTCAATGCTC	ACGCTGTAGG	TATCTCAGTT
1800	CGGTGTAGGT	CGTTCGCTCC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCCCCCGTT
1850	CAGCCCGACC	GCTGCGCCTT	ATCCGGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC
1900	GGTAAGACAC	GACTTATCGC	CACTGGCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA
1950	GCAGAGCGAG	GTATGTAGGC	GGTGCTACAG	AGTTCTTGAA	GTGGTGGCCT
2000	AACTACGGCT	ACACTAGAAG	GACAGTATTT	GGTATCTGCG	CTCTGCTGAA
2050	GCCAGTTACC	TTCGGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	GGCAAACAAA
2100	CCACCGCTGG	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACGCGC
2150	AGAAAAAAAG	GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATCTTTTCTA	CGGGGTCTGA
2200	CGCTCAGTGG	AACGAAAACT	CACGTTAAGG	GATTTTGGTC	ATGAGATTAT
2250	CAAAAAGGAT	CTTCACCTAG	ATCCTTTTAA	ATTAAAAATG	AAGTTTTTAA
2300	TCAATCTAAA	GTATATATGA	GTAAACTTGG	TCTGACAGTT	ACCAATGCTT
2350	AATCAGTGAG	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTTCTG	TCATCCATAG
2400	TTGCCTGACT	CCCCGTCTGT	TAGATAACTA	CGATACGGGA	GGGCTTACCA
2450	TCTGGCCCCA	GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC
2500	AGATTTATCA	GCAATAAACC	AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAGTG
2550	GTCTTGCAAC	TTTATCCGCC	TCCATCCAGT	CTATTAATTG	TTGCCGGGAA

Abbildung 4 (Fortsetzung)

	10	20	30	40	50
2600	GCTAGAGTAA	GTAGTTCGCC	AGTTAATAGT	TTGCGCAACG	TTGTTGCCAT
2650	TGCTACAGGC	ATCGTGGTGT	CACGCTCGTC	GTTTGGTATG	GCTTCATTCA
2700	GCTCCGGTTC	CCAACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC
2750	AAAAAAGCGG	TTAGCTCCTT	CGGTCTCTCG	ATCGTTGTCA	GAAGTAAGTT
2800	GGCCGCAGTG	TTATCACTCA	TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATTCTCTTA
2850	CTGTCATGCC	ATCCGTAAGA	TGCTTTTCTG	TGACTGGTGA	GTA CTCAACC
2900	AAGTCATTCT	GAGAATAGTG	TATGCGGCGA	CCGAGTTGCT	CTTGCCCCGGC
2950	GTCAATACGG	GATAATACCG	CGCCACATAG	CAGAACTTTA	AAAGTGCTCA
3000	TCATTGGAAA	ACGTTCTTCG	GGGCGAAAAAC	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG
3050	TTGAGATCCA	GTTTCGATGTA	ACCCACTCGT	GCACCCAACT	GATCTTCAGC
3100	ATCTTTTACT	TTCAACCAGCG	TTTCTGGGTG	AGCAAAAACA	GGAAGGCCAAA
3150	ATGCCGCAAA	AAAGGGAATA	AGGGCGACAC	GGAAATGTTG	AATACTCATA
3200	CTCTTCCTTT	TTCAATATTA	TTGAAGCATT	TATCAGGGTT	ATTGTCTCAT
3250	GAGCGGATAC	ATATTTGAAT	GTATTTAGAA	AAATAAACAA	ATAGGGGTTC
3300	CGCGCACATT	TCCCCGAAAA	GTGCCACCTG	ACGTCTAAGA	AACCATTATT
3350	ATCATGACAT	TAACCTATAA	AAATAGGCGT	ATCACGAGGC	CCTTTCTGCT
3400	TCA				

Abbildung 5

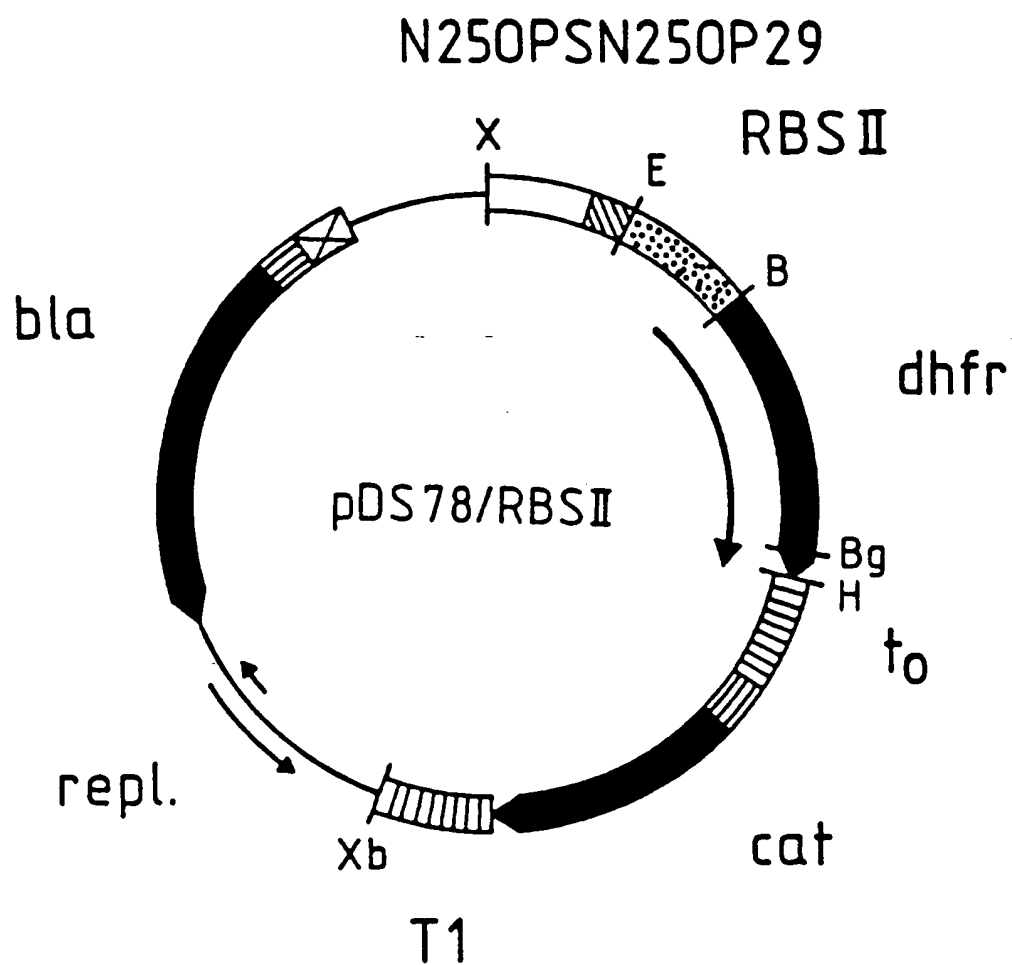


Abbildung 6

	10	20	30	40	50
1	<u>CTCGAGAAAT</u>	CATAAAAAAT	TTATTTGCTT	TGTGAGCGGA	TAACAATTAT
51	AATAGATTCA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGAA	TTCATTAAAG
101	AGGAGAAATT	AACTATGAGA	<u>GGATCCGGCA</u>	TCATGGTTCG	ACCATTTGAAC
151	<u>TGCATCGTCG</u>	CCGTGTCCCA	AAATATGGGG	ATTGGCAAGA	ACGGAGACCT
201	<u>ACCCTGGCCT</u>	CCGCTCAGGA	ACGAGTTCAA	GTACTTCCAA	AGAATGACCA
251	<u>CAACCTCTTC</u>	AGTGGAAGGT	AAACAGAATC	TGGTGATTAT	GGGTAGGAAA
301	<u>ACCTGGTTCT</u>	CCATTCCTGA	GAAGAATCGA	CCTTTAAAGG	ACAGAATTAA
351	<u>TATAGTTCTC</u>	AGTAGAGAAC	TCAAAGAACC	ACCACGAGGA	GCTCATTTTC
401	<u>TTGCCAAAAG</u>	TTTGGATGAT	GCCTTAAGAC	TTATTGAACA	ACCGGAATTG
451	<u>GCAAGTAAAG</u>	TAGACATGGT	TTGGATAGTC	GGAGGCAGTT	CTGTTTACCA
501	<u>GGAAGCCATG</u>	AATCAACCAG	GCCACCTTAG	ACTCTTTGTG	ACAAGGATCA
551	<u>TGCAGGAATT</u>	TGAAAGTGAC	ACGTTTTTCC	CAGAAATTGA	TTTGGGGAAA
601	<u>TATAAACTTC</u>	TCCCAGAATA	CCCAGGCGTC	CTCTCTGAGG	TCCAGGAGGA
651	<u>AAAAGGCATC</u>	AAGTATAAGT	TTGAAGTCTA	CGAGAAGAAA	GGTTCAGAT
701	<u>CTGTTAACCT</u>	AGTTTAACAG	GAAGATGCTT	TCAAGTTCTC	TGCTCCCCTC
751	CTAAAGCTAT	GCATTTTAT	AAGACCATGG	GACTTTTGCT	GGCTTTAGAT
801	<u>CCGGCCAAAGC</u>	TTGGACTCCT	GTTGATAGAT	CCAGTAATGA	CCTCAGAACT
851	CCATCTGGAT	TTGTTTCAGAA	CGCTCGGTTG	CCGCCGGGCG	TTTTTTATTG
901	GTGAGAATCC	AAGCTAGCTT	GGCGAGATTT	TCAGGAGCTA	AGGAAGCTAA
951	AATGGAGAAA	AAAATCACTG	GATATACCAC	CGTTGATATA	TCCCAATGGC
1001	ATCGTAAAGA	ACATTTTGAG	GCATTTTCAGT	CAGTTGCTCA	ATGTACCTAT
1051	AACCAGACCG	TTCAGCTGGA	TATTACGGCC	TTTTTAAAGA	CCGTAAAGAA
1101	AAATAAGCAC	AAGTTTTATC	CGGCCTTTAT	TCACATTCTT	GCCCCGCTGA
1151	TGAATGCTCA	TCCGGAATTT	CGTATGGCAA	TGAAAGACGG	TGAGCTGGTG

Abbildung 6 (Fortsetzung)

1201 ATATGGGATA GTGTTACCCC TTGTTACACC GTTTTCCATG AGCAAACCTGA
 1251 AACGTTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA CGACGATTTC CGGCAGTTTC
 1301 TACACATATA TTCGCAAGAT GTGGCGTGTT ACGGTGAAAA CCTGGCCTAT
 1351 TTCCCTAAAG GGTTTATTGA GAATATGTTT TTCGTCTCAG CCAATCCCTG
 1401 GGTGAGTTTC ACCAGTTTTG ATTTAAACGT GGCCAATATG GACAACTTCT
 1451 TCGCCCCCGT TTTCACCATG GGCAATATT ATACGCAAGG CGACAAGGTG
 1501 CTGATGCCGC TGGCGATTCA GGTTCATCAT GCCGTCTGTG ATGGCTTCCA
 1551 TGTCGGCAGA ATGCTTAATG AATTACAACA GTACTGCGAT GAGTGGCAGG
 1601 GCGGGGCGTA ATTTTTTTAA GGCAGTTATT GGTGCCCTTA AACGCCTGGG
 1651 GTAATGACTC TCTAGCTTGA GGCATCAAAT AAAACGAAAG GCTCAGTCGA
 1701 AAGACTGGGC CTTTCGTTTT ATCTGTTGTT TGTCGGTGAA CGCTCTCCTG
 1751 AGTAGGACAA ATCCGCCGCT CTAGAGCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA
 1801 CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC
 1851 TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT
 1901 GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC CAGTCACGTA GCGATAGCGG
 1951 AGTGTATACT GGCTTAACTA TGCGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT
 2001 GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC
 2051 GCATCAGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC
 2101 TGTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT
 2151 ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC
 2201 AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT
 2251 AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG
 2301 GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTGGAA
 2351 GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG
 2401 TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCAGCTG
 2451 TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCT CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
 2501 ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT

Abbildung 6 (Fortsetzung)

2551 CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC
 2601 TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT
 2651 TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC
 2701 TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG
 2751 ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC
 2801 AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT
 2851 TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT
 2901 GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAAATTAAA
 2951 AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC
 3001 AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT
 3051 TCGTTCATCC ATAGCTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC
 3101 GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA
 3151 CGCTCACC GG CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC
 3201 CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA
 3251 ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC
 3301 AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG
 3351 TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT
 3401 CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT
 3451 GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT.
 3501 GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG
 3551 GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT
 3601 TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC
 3651 TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TCCGGGGCGA AACTCTCAA
 3701 GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGACCCC
 3751 AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA
 3801 AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT
 3851 GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG
 3901 GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA

Abbildung 6 (Fortsetzung)

3951 ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCT
4001 AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG
4051 AGGCCCTTTC GTCTTCAC

Abbildung 7

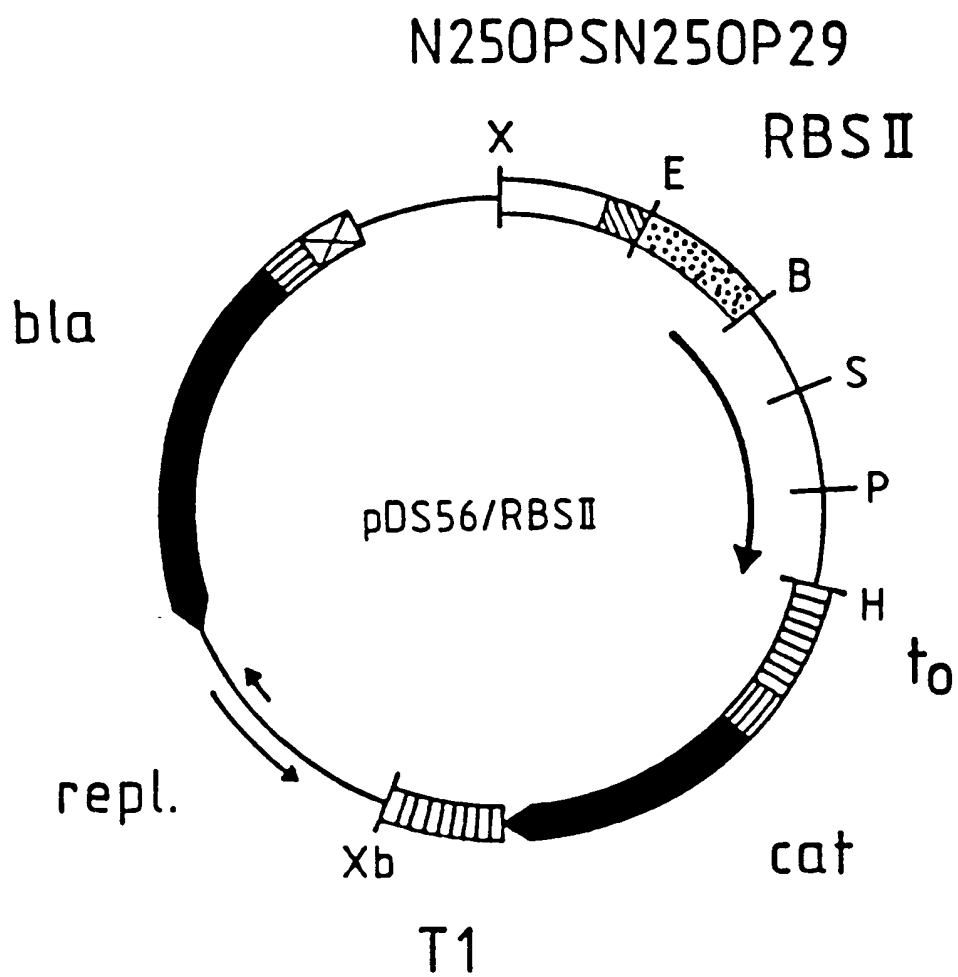


Abbildung 8

	10	20	30	40	50
1	<u>CTCGAGAAAT</u>	CATAAAAAAT	TTATTGCTT	TGTGAGCGGA	TAACAATTAT
51	AATAGATTCA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGAA	<u>TTCATTAAAG</u>
101	AGGAGAAATT	AACTATGAGA	<u>GGATCCGTCG</u>	<u>ACCTGCAGCC</u>	<u>AAGCTTAATT</u>
151	<u>AGCTGAGCTT</u>	GGACTCCTGT	TGATAGATCC	AGTAATGACC	TCAGAACTCC
201	ATCTGGATTT	GTTTCAAGCG	CTCGGTTGCC	GCCGGGCGTT	TTTTATTGGT
251	GAGAATCCAA	GCTAGCTTGG	CGAGATTTTC	AGGAGCTAAG	GAAGCTAAAA
301	TGGAGAAAAA	AATCACTGGA	TATACCACCG	TTGATATATC	CCAATGGCAT
351	CGTAAAGAAC	ATTTTGAGGC	ATTTCACTCA	GTTGCTCAAT	GTACCTATAA
401	CCAGACCGTT	CAGCTGGATA	TTACGGCCTT	TTTAAAGACC	GTAAAGAAAA
451	ATAAGCACAA	GTTTTATCCG	GCCTTTATTC	ACATTCTTGC	CCGCCTGATG
501	AATGCTCATC	CGGAATTTTC	TATGGCAATG	AAAGACGGTG	AGCTGGTGAT
551	ATGGGATAGT	GTTACCCCTT	GTTACACCGT	TTTCCATGAG	CAAAGTGAAA
601	CGTTTTTCATC	GCTCTGGAGT	GAATACCACG	ACGATTTCCG	GCAGTTTCTA
651	CACATATATT	CGCAAGATGT	GGCGTGTTAC	GGTGAAAACC	TGGCCTATTT
701	CCCTAAAGGG	TTTATTGAGA	ATATGTTTTT	CGTCTCAGCC	AATCCCTGGG
751	TGAGTTTCAC	CAGTTTTGAT	TTAAACGTGG	CCAATATGGA	CAACTTCTTC
801	GCCCCCGTTT	TCACCATGGG	CAAATATTAT	ACGCAAGGCG	ACAAGGTGCT
851	GATGCCGCTG	GCGATTCAGG	TTCATCATGC	CGTCTGTGAT	GGCTTCCATG
901	TCGGCAGAAT	GCTTAATGAA	TTACAACAGT	ACTGCGATGA	GTGGCAGGGC
951	GGGGCGTAAT	TTTTTTAAGG	CAGTTATTGG	TGCCCTTAAA	CGCCTGGGGT
1001	AATGACTCTC	TAGCTTGAGG	CATCAAATAA	AACGAAAGGC	TCAGTCGAAA
1051	GACTGGGCTT	TTGTTTTTAT	CTGTTGTTTG	TCGGTGAACG	CTCTCCTGAG
1101	TAGGACAAAT	CCGCCGCTCT	<u>AGAGCTGCCT</u>	CGCGCGTTTC	GGTGATGACG
1151	GTGAAAACCT	CTGACACATG	CAGCTCCCGG	AGACGGTCAC	AGCTTGTCTG

Abbildung 8 (Fortsetzung)

1201 TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT
 1251 TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG
 1301 TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC
 1351 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
 1401 ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG
 1451 TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT
 1501 CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG
 1551 CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG
 1601 GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT
 1651 GGCAGAAACC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
 1701 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC
 1751 CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA
 1801 GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC
 1851 GAACCCCCCG ^{TT}TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT
 1901 TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG
 1951 GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
 2001 AAGTGGTGGC CTAAC TACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG
 2051 CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT
 2101 CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG
 2151 CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC
 2201 TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG
 2251 TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA
 2301 TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAACTT GGTCTGACAG
 2351 TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT
 2401 GTTCATCCAT AGCTGCCTGA CTCCCCGTG TGTAGATAAC TACGATACGG
 2451 GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG
 2501 CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG

Abbildung 8 (Fortsetzung)

2551 AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
2601 TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA
2651 CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGA
2701 TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC
2751 CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT
2801 CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC
2851 ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
2901 GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG
2951 CTCTTGCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT
3001 TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG
3051 ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA
3101 CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA
3151 CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
3201 TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG
3251 TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC
3301 AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA
3351 GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG
3401 GCCCTTTCGT CTTCAC

Abbildung 9

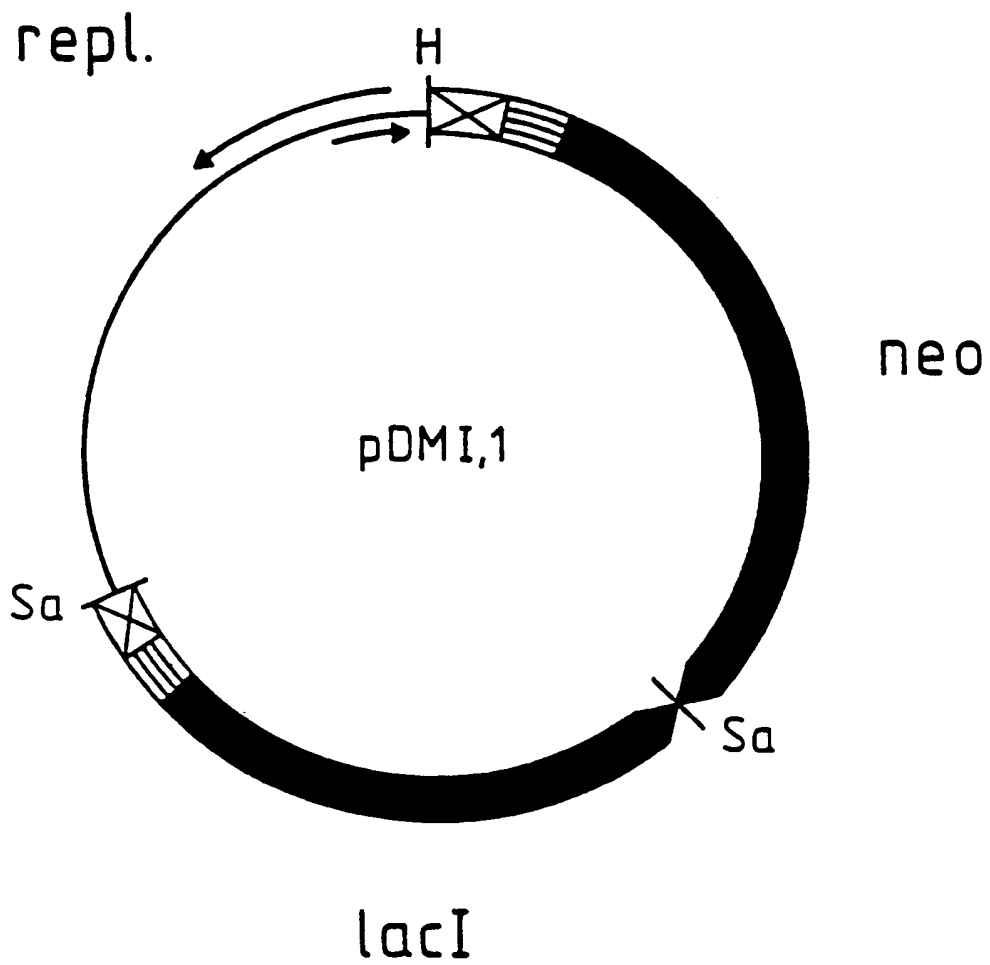


Abbildung 10

	10	20	30	40	50
0	<u>AAGCTT</u> CACG	CTGCCGCAAG	CACTCAGGGC	GCAAGGGCTG	CTAAAGGAAG
50	CGGAACACGT	AGAAAGCCAG	TCCGCAGAAA	CGGTGCTGAC	CCCGGATGAA
100	TGTCAGCTAC	TGGGCTATCT	GGACAAGGGA	AAACGCAAGC	GCAAAGAGAA
150	AGCAGGTAGC	TTGCAGTGGG	CTTACATGGC	GATAGCTAGA	CTGGGCGGTT
200	TTATGGACAG	CAAGCGAACC	GGAATTGCCA	GCTGGGGCGC	CCTCTGGTAA
250	GGTTGGGAAG	CCCTGCAAAG	TAAACTGGAT	GGCTTTCTTG	CCGCCAAGGA
300	TCTGATGGCG	CAGGGGATCA	AGATCTGATC	AAGAGACAGG	ATGAGGATCG
350	<u>TTTCGC</u> ATGA	<u>TTGAACAAGA</u>	<u>TGGATTGCAC</u>	<u>GCAGGTTCTC</u>	<u>CGGCCGCTTG</u>
400	<u>GGTGGAGAGG</u>	<u>CTATTCGGCT</u>	<u>ATGACTGGGC</u>	<u>ACAACAGACA</u>	<u>ATCGGCTGCT</u>
450	<u>CTGATGCCGC</u>	<u>CGTGTTCGGG</u>	<u>CTGTCAGCGC</u>	<u>AGGGGCGCCC</u>	<u>GGTTCTTTTT</u>
500	<u>GTCAAGACCG</u>	<u>ACCTGTCCGG</u>	<u>TGCCCTGAAT</u>	<u>GAACTGCAGG</u>	<u>ACGAGGCAGC</u>
550	<u>GCGGCTATCG</u>	<u>TGGCTGGCCA</u>	<u>CGACGGGCGT</u>	<u>TCCTTGCGCA</u>	<u>GCTGTGCTCG</u>
600	<u>ACGTTGTAC</u>	<u>TGAAGCGGGA</u>	<u>AGGGACTGGC</u>	<u>TGCTATTGGG</u>	<u>CGAAGTGCCG</u>
650	<u>GGGCAGGATC</u>	<u>TCCTGTGATC</u>	<u>TCACCTTGCT</u>	<u>CCTGCCGAGA</u>	<u>AAGTATCCAT</u>
700	<u>CATGGCTGAT</u>	<u>GCAATGCCGG</u>	<u>GGCTGCATAC</u>	<u>GCTTGATCCG</u>	<u>GCTACCTGCC</u>
750	<u>CATTGACCA</u>	<u>CCAAGCGAAA</u>	<u>CATCGCATCG</u>	<u>AGCGAGCACG</u>	<u>TACTCGGATG</u>
800	<u>GAAGCCGGTC</u>	<u>TTGTCGATCA</u>	<u>GGATGATCTG</u>	<u>GACGAAGAGC</u>	<u>ATCAGGGGCT</u>
850	<u>CGCGCCAGCC</u>	<u>GAACTGTTCC</u>	<u>CCAGGGCTCAA</u>	<u>GGCGCGCATG</u>	<u>CCCGACGGCG</u>
900	<u>AGGATCTCGT</u>	<u>CGTGACCCAT</u>	<u>GGCGATGCCT</u>	<u>GCTTGCCGAA</u>	<u>TATCATGGTG</u>
950	<u>GAAAAATGGCC</u>	<u>GCTTTTCTGG</u>	<u>ATTCATCGAC</u>	<u>TGTGGCCGGC</u>	<u>TGGGTGTGGC</u>
1000	<u>CGACCGCTAT</u>	<u>CAGGACATAG</u>	<u>CGTTGGCTAC</u>	<u>CCGTGATATT</u>	<u>GCTGAAGAGC</u>
1050	<u>TTGGCGGGCA</u>	<u>ATGGGCTGAC</u>	<u>CGCTTCCTCG</u>	<u>TGCTTTACGG</u>	<u>TATCGCCGCT</u>
1100	<u>CCCGATTCCG</u>	<u>AGCGCATCCG</u>	<u>CTTCTATCCG</u>	<u>CTTCTTGACG</u>	<u>AGTTCTTCTG</u>
1150	<u>AGCGGGACTC</u>	<u>TGGGGTTCCA</u>	<u>AATGACCGAC</u>	<u>CAAGCGACGC</u>	<u>CCAACCTGCC</u>
1200	<u>ATCACGAGAT</u>	<u>TTCGATTCCA</u>	<u>CGCGCGCCTT</u>	<u>CTATGAAAGG</u>	<u>TTGGGCTTCG</u>
1250	<u>GAATCGTTTT</u>	<u>CCGGGACGCC</u>	<u>GGCTGGATGA</u>	<u>TCCTCCAGCG</u>	<u>CGGGGATCTC</u>
1300	<u>ATGCTGGAGT</u>	<u>TCTTCGCCCA</u>	<u>CCCCGGGCTC</u>	<u>GATCCCCCTC</u>	<u>CGAGTTGGTT</u>
1350	<u>CAGCTGCTGC</u>	<u>CTGAGGCTGG</u>	<u>ACGACCTCGC</u>	<u>GGAGTTCTAC</u>	<u>CGGCAGTGCA</u>
1400	<u>AATCCGTCGG</u>	<u>CATCCAGGAA</u>	<u>ACCAGCAGCG</u>	<u>GCTATCCGCG</u>	<u>CATCCATGCC</u>
1450	<u>CCCGAACTGC</u>	<u>AGGAGTGGGG</u>	<u>AGGCACGATG</u>	<u>GCCGCTTTGG</u>	<u>TCGACAATTC</u>
1500	<u>GCGCTAACTT</u>	<u>ACATTAATTG</u>	<u>CGTTGCGCTC</u>	<u>ACTGCCCGCT</u>	<u>TTCCAGTCCG</u>
1550	<u>GAAACCTGTC</u>	<u>GTGCCAGCTG</u>	<u>CATTAATGAA</u>	<u>TCGGCCAACG</u>	<u>CGCGGGGAGA</u>
1600	<u>GGCGGTTTGC</u>	<u>GTATTGGGCG</u>	<u>CCAGGGTGGT</u>	<u>TTTTCTTTTC</u>	<u>ACCAGTGAGA</u>
1650	<u>CGGGCAACAG</u>	<u>CTGATTGCCC</u>	<u>TTACCGCCT</u>	<u>GGCCCTGAGA</u>	<u>GAGTTGCAGC</u>
1700	<u>AAGCGGTCCA</u>	<u>CGCTCGTTTG</u>	<u>CCCCAGCAGG</u>	<u>CGAAAACTCT</u>	<u>GTTTGATGGT</u>
1750	<u>GCTTAACGGC</u>	<u>GGGATATAAC</u>	<u>ATGAAGCTGTC</u>	<u>TTCCGGTATCG</u>	<u>TCGTATCCCA</u>
1800	<u>CTACCCAGAT</u>	<u>ATCCGCACCA</u>	<u>ACGCGCAGCC</u>	<u>CGGACTCGGT</u>	<u>AATGGCGCGC</u>
1850	<u>ATTGGGCCCCA</u>	<u>GCGCCATCTG</u>	<u>ATCGTTGGCA</u>	<u>ACCAGCATCG</u>	<u>CACTGGGAAC</u>

Abbildung 10 (Fortsetzung)

	10	20	30	40	50
1900	<u>GATGCCCTCA</u>	<u>TTCAGCATTT</u>	<u>GCATGGTTTG</u>	<u>TTGAAAACCG</u>	<u>GACATGGCAC</u>
1950	<u>TCCAGTCGCC</u>	<u>TTCCCGTTCC</u>	<u>GCTATCGGCT</u>	<u>GAATTTGATT</u>	<u>GCGAGTGAGA</u>
2000	<u>TATTTATGCC</u>	<u>AGCCAGCCAG</u>	<u>ACGCAGACGC</u>	<u>GCCGAGACAG</u>	<u>AACTTAATGG</u>
2050	<u>GCCCGCTAAC</u>	<u>AGCGCGATTT</u>	<u>GCTGGTGACC</u>	<u>CAATGGGACC</u>	<u>AGATGCTCCA</u>
2100	<u>CGCCCACTCG</u>	<u>CGTACCGTCT</u>	<u>TCATGGGAGA</u>	<u>AAATAATACT</u>	<u>GTTGATGGGT</u>
2150	<u>GTCTGGTCAG</u>	<u>AGACATCAAG</u>	<u>AAATAACGCC</u>	<u>GGAACATTAG</u>	<u>TGCAGGCAGC</u>
2200	<u>TTCCACAGCA</u>	<u>ATGGCATCCT</u>	<u>GGTCATCCAG</u>	<u>CGGATAGTTA</u>	<u>ATGATCAGCC</u>
2250	<u>CACTGACCGC</u>	<u>TTGCGCGAGA</u>	<u>AGATTGTGCA</u>	<u>CCGCCGCTTT</u>	<u>ACAGGCTTCG</u>
2300	<u>ACGCCGCTTC</u>	<u>GTTCTACCAT</u>	<u>CGACACCACC</u>	<u>ACGCTGGCAC</u>	<u>CCAGTTGATC</u>
2350	<u>GGCGCGAGAT</u>	<u>TTAATCGCCG</u>	<u>CGACAATTTG</u>	<u>CGACGGCGCG</u>	<u>TGCAGGGCCA</u>
2400	<u>GACTGGAGGT</u>	<u>GGCAACGCCA</u>	<u>ATCAGCAACG</u>	<u>ACTGTTTGCC</u>	<u>CGCCAGTTGT</u>
2450	<u>TGTGCCACGC</u>	<u>GGTTGGGAAT</u>	<u>GTAATTCAGC</u>	<u>TCCGCCATCG</u>	<u>CCGCTTCCAC</u>
2500	<u>TTTTTCCCGC</u>	<u>GTTTTCGCAG</u>	<u>AAACGTGGCT</u>	<u>GGCCTGGTTC</u>	<u>ACCACGCGGG</u>
2550	<u>AAACGGTCTG</u>	<u>ATAAGAGACA</u>	<u>CCGGCATACT</u>	<u>CTGCGACATC</u>	<u>GTATAACGTT</u>
2600	<u>ACTGGTTTCA</u>	<u>CATTCACCAC</u>	<u>CCTGAATTGA</u>	<u>CTCTCTTCCG</u>	<u>GGCGCTATCA</u>
2650	<u>TGCCATACCG</u>	<u>CGAAAGGTTT</u>	<u>TGCACCATTC</u>	<u>GATGGTGTC</u>	<u>ACGTAAATGC</u>
2700	<u>ATGCCGCTTC</u>	<u>GCCTTCGCGC</u>	<u>GCGAATTGTC</u>	<u>GACCTGTCC</u>	<u>CTCCTGTTCA</u>
2750	<u>GCTACTGACG</u>	<u>GGGTGGTGCG</u>	<u>TAACGGCAAA</u>	<u>AGCACCGCCG</u>	<u>GACATCAGCG</u>
2800	<u>CTAGCGGAGT</u>	<u>GTATACTGGC</u>	<u>TTACTATGTT</u>	<u>GGCACTGATG</u>	<u>AGGGTGTCAG</u>
2850	<u>TGAAGTGCTT</u>	<u>CATGTGGCAG</u>	<u>GAGAAAAAAG</u>	<u>GCTGCACCGG</u>	<u>TGCGTCAGCA</u>
2900	<u>GAATATGTGA</u>	<u>TACAGGATAT</u>	<u>ATTCCGCTTC</u>	<u>CTCGCTCACT</u>	<u>GACTCGCTAC</u>
2950	<u>GCTCGGTGCT</u>	<u>TCGACTGCGG</u>	<u>CGAGCGGAAA</u>	<u>TGGCTTACGA</u>	<u>ACGGGGCGGA</u>
3000	<u>GATTTCCCTG</u>	<u>AAGATGCCAG</u>	<u>GAAGATACTT</u>	<u>AACAGGGAAG</u>	<u>TGAGAGGGCC</u>
3050	<u>GCGGCAAAAG</u>	<u>CGTTTTTTCCA</u>	<u>TAGGCTCCGC</u>	<u>CCCCCTGACA</u>	<u>AGCATCAGGA</u>
3100	<u>AATCTGACGC</u>	<u>TCAAATCAGT</u>	<u>GGTGGCGAAA</u>	<u>CCCGACAGGA</u>	<u>CTATAAAGAT</u>
3150	<u>ACCAGGCGTT</u>	<u>TCCCCCTGGCG</u>	<u>GCTCCCTCGT</u>	<u>GCGCTCTCCT</u>	<u>GTTCTGCGCT</u>
3200	<u>TTCGGTTTAC</u>	<u>CGGTGTCATT</u>	<u>CCGCTGTTAT</u>	<u>GGCCGGGTTT</u>	<u>GTCTCATTCC</u>
3250	<u>ACGCCTGACA</u>	<u>CTCAGTTCCG</u>	<u>GGTAGGCAGT</u>	<u>TGGCTCCAAG</u>	<u>CTGGACTGTA</u>
3300	<u>TGCACGAACC</u>	<u>CCCCGTTTCA</u>	<u>TCCGACCGCT</u>	<u>GCGCCTTATC</u>	<u>CGGTAACAT</u>
3350	<u>CGTCTTGAGT</u>	<u>CCAACCCGGA</u>	<u>AAGACATGCA</u>	<u>AAAGCACCA</u>	<u>TGGCAGCAGC</u>
3400	<u>CACTGGTAAT</u>	<u>TGATTTAGAG</u>	<u>GAGTTAGTCT</u>	<u>TGAAGTCATG</u>	<u>CGCCGGTTAA</u>
3450	<u>GGCTAAACTG</u>	<u>AAAGGACAAG</u>	<u>TTTTGGTGAC</u>	<u>TGCGCTCCTC</u>	<u>CAAGCCAGTT</u>
3500	<u>ACCTCGGTTT</u>	<u>AAAGAGTTGG</u>	<u>TAGCTCAGAG</u>	<u>AACCTTCGAA</u>	<u>AAACCGCCCT</u>
3550	<u>GCAAGGCGGT</u>	<u>TTTTTCGTTT</u>	<u>TCAGAGCAAG</u>	<u>AGATTACGCG</u>	<u>CAGACCAAAA</u>
3600	<u>CGATCTCAAG</u>	<u>AAGATCATCT</u>	<u>TATTAATCAG</u>	<u>ATAAAATATT</u>	<u>TCTAGATTTT</u>
3650	<u>AGTGCAATTT</u>	<u>ATCTCTTCAA</u>	<u>ATGTAGCACC</u>	<u>TGAAGTCAGC</u>	<u>CCCATACGAT</u>
3700	<u>ATAAGTTGTT</u>	<u>AATTCTCATG</u>	<u>TTTGACAGCT</u>	<u>TATCATCGAT</u>	

Abbildung 11

Adaptor 1:	(SphI)	(NdeI)	CAGGACCCA GTACGTCCTGGGTAT
Adaptor 2:	(HinfI)	(HindIII)	AGTCAGATGCTGTAGTTAACA GTCTACGACATCAATTGTTCTGA
Adaptor 3:	(SphI)	<u>NaeI</u>	<u>NarI</u> (BamHI) CATCACGCCGGCATCGAAGGGCGCCTTG GTACGTAGTGCGGCCGTAGCTTCCCGCGGAACCTAG
Adaptor 4:	(NarI)	(NdeI)	CGCCAAGATCCA GGTTCTAGGTAT
Adaptor 5:	(NaeI)	(NdeI)	GGCGATGACGATGACAAACAAGATCCA CCGCTACTGCTACTGTTTGTTCCTAGGTAT
Adaptor 6:	(NarI)	(NdeI)	CGCCAAAACCCA GGTTTGGGTAT

Abbildung 11 (Fortsetzung)

		(BamHI)
Adaptor 7:	GATCGCATCACCATCACCATCACG	
	CGTAGTGGTAGTGGTAGTGCCTAG	
		(BamHI)
Adaptor 8:	GATCGCATCACCATCACG	
	CGTAGTGGTAGTGCCTAG	
	(BamHI) <u>BglII</u>	(HindIII)
Adaptor 9:	GATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTA	
	GTCTAGAGTAGTGGTAGTGGTAGTGATTCTGA	
	(BamHI) <u>BglII</u>	(HindIII)
Adaptor 10:	GATCCAGATCTCATCACCATCACTA	
	GTCTAGAGTAGTGGTAGTGATTCTGA	
	(BamHI) <u>BglII</u>	(HindIII)
Adaptor 11:	GATCCAGATCTCATCACTA	
	GTCTAGAGTAGTGATTCTGA	

Abbildung 12

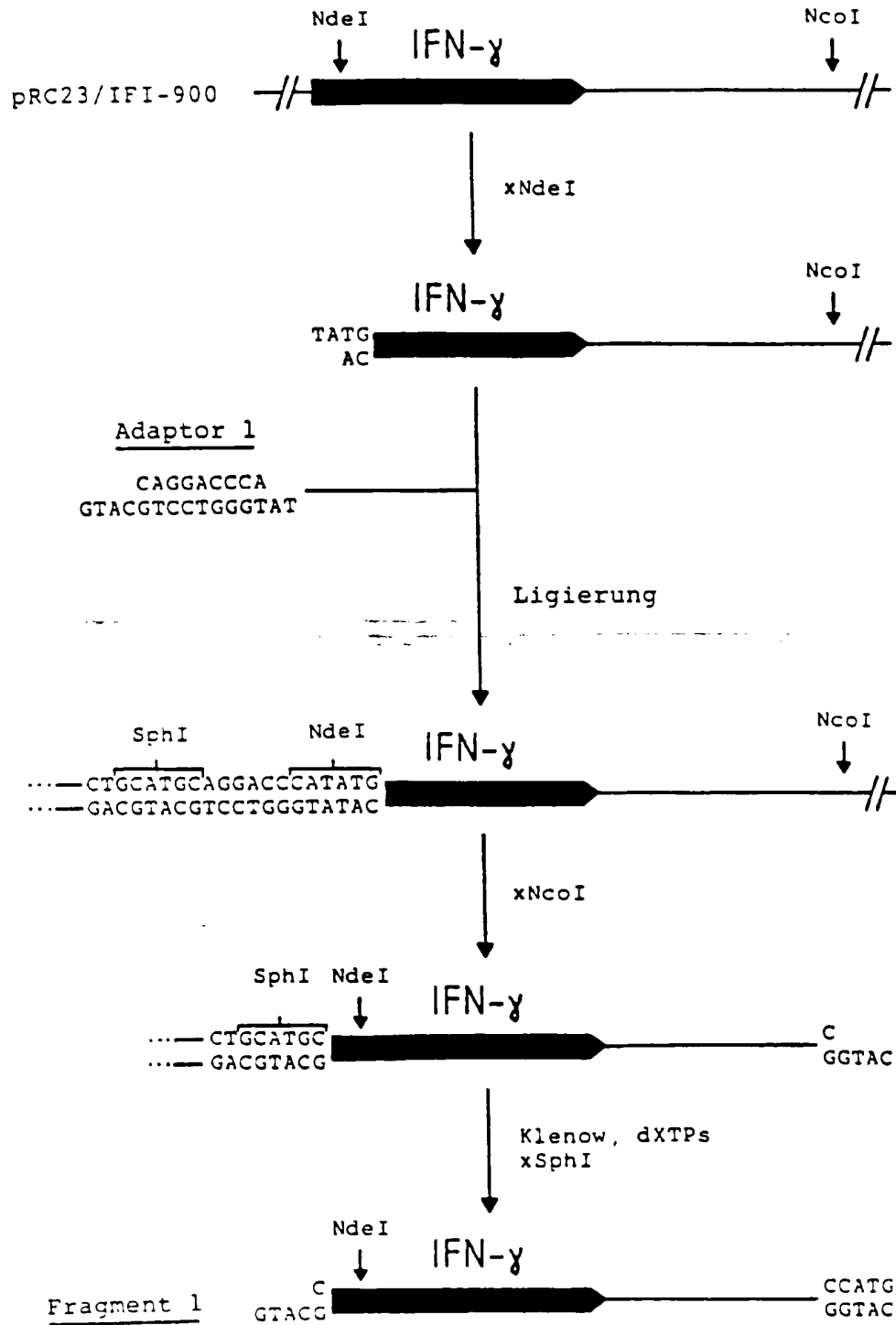


Abbildung 13

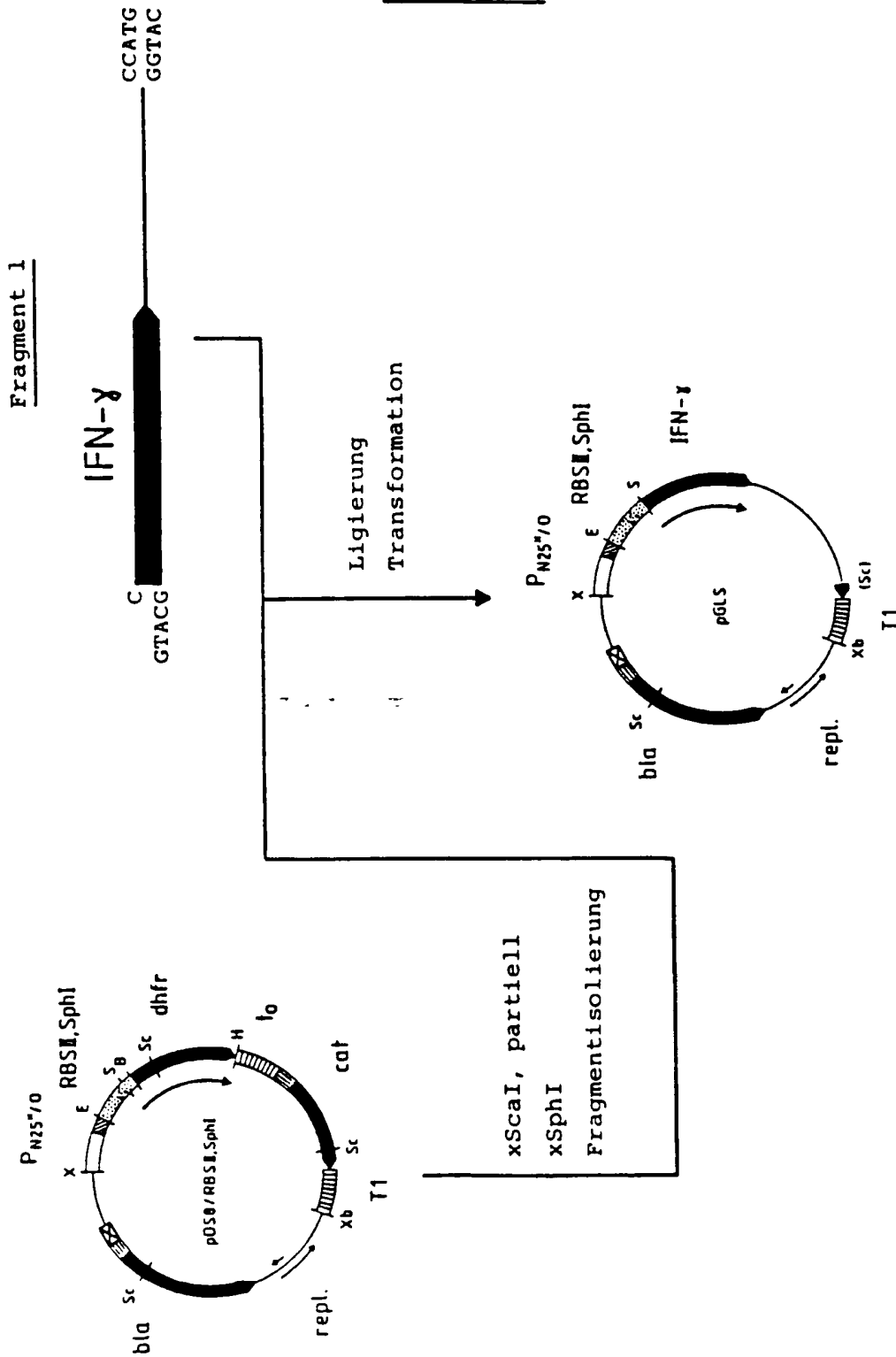


Abbildung 14

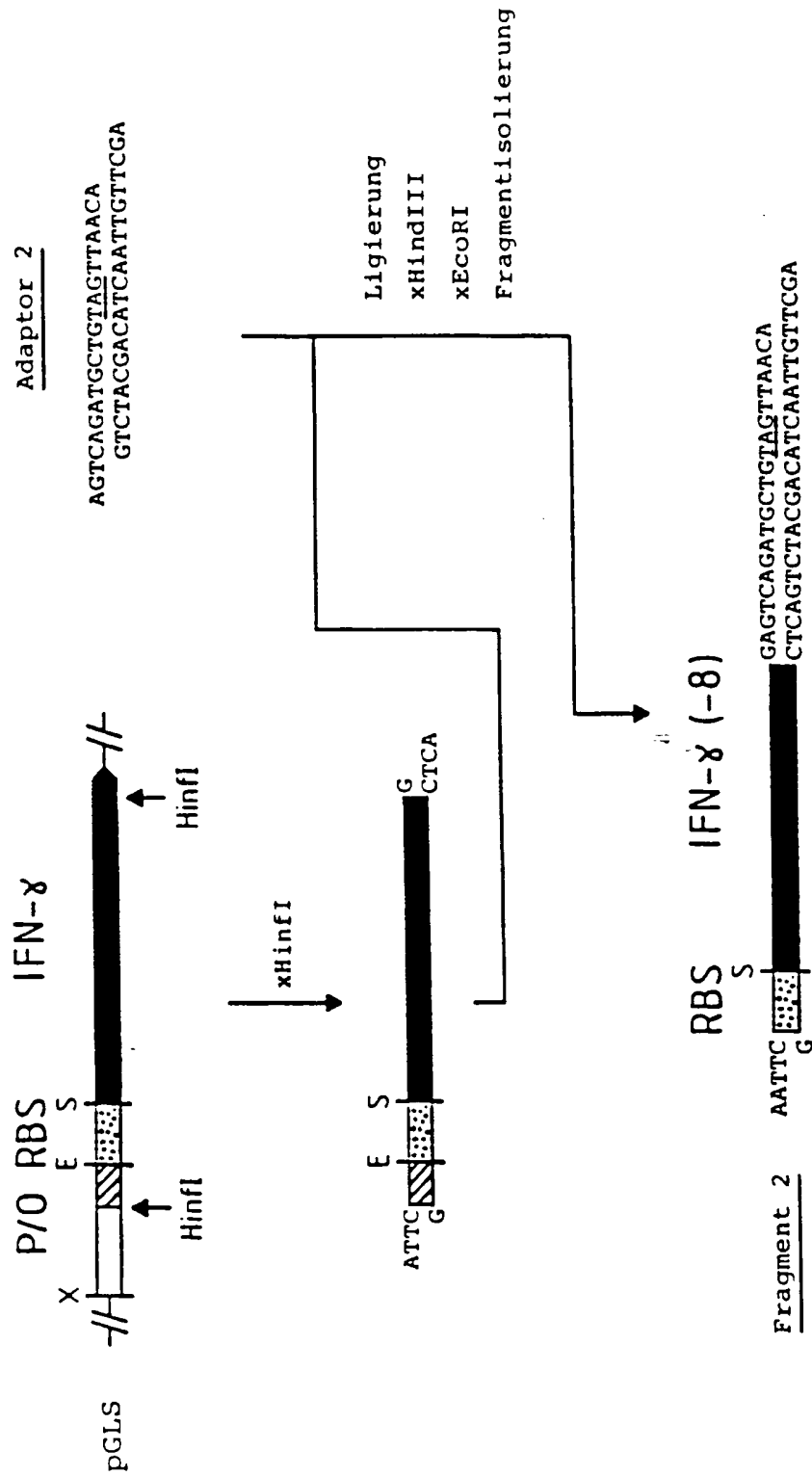


Abbildung 15

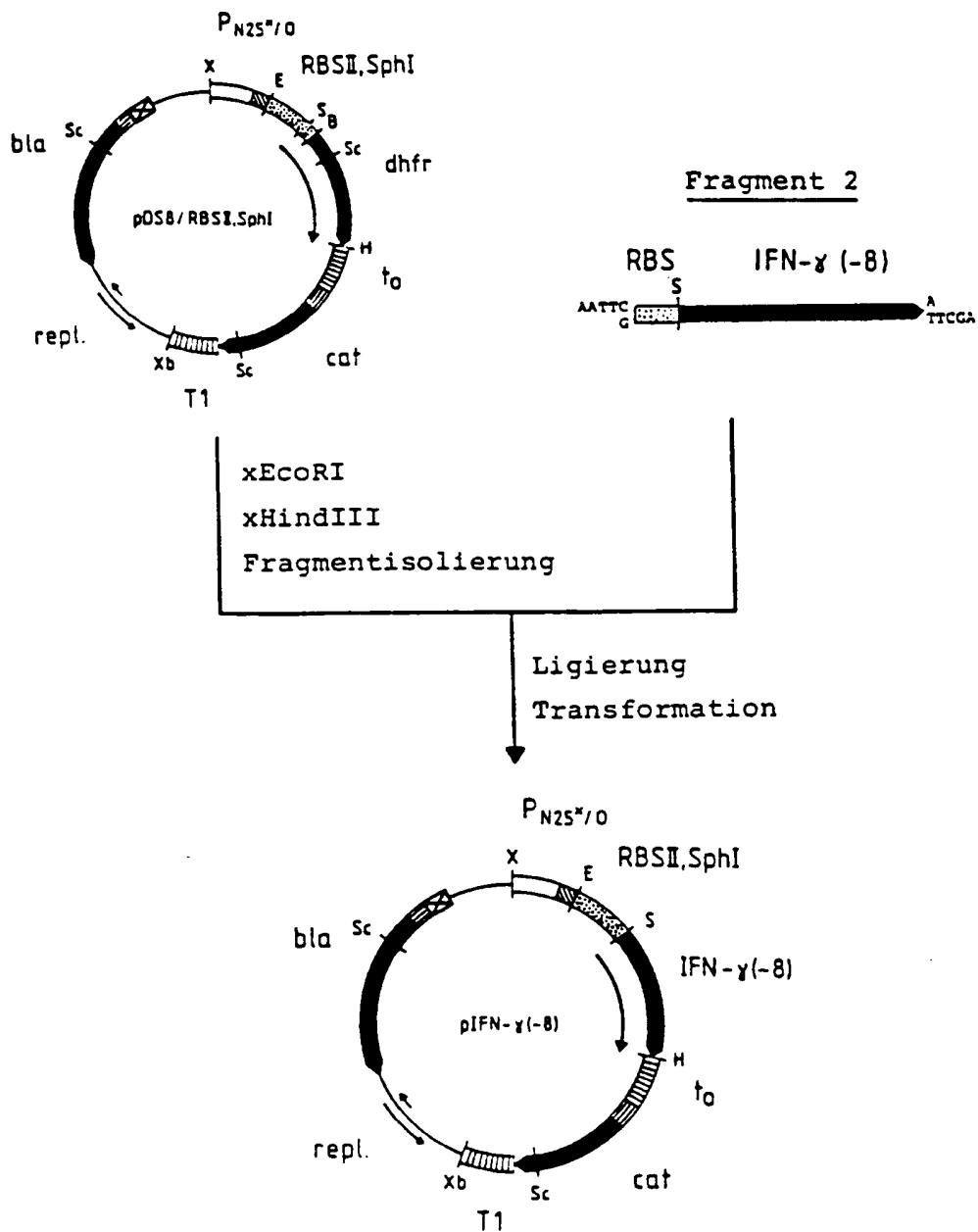


Abbildung 16

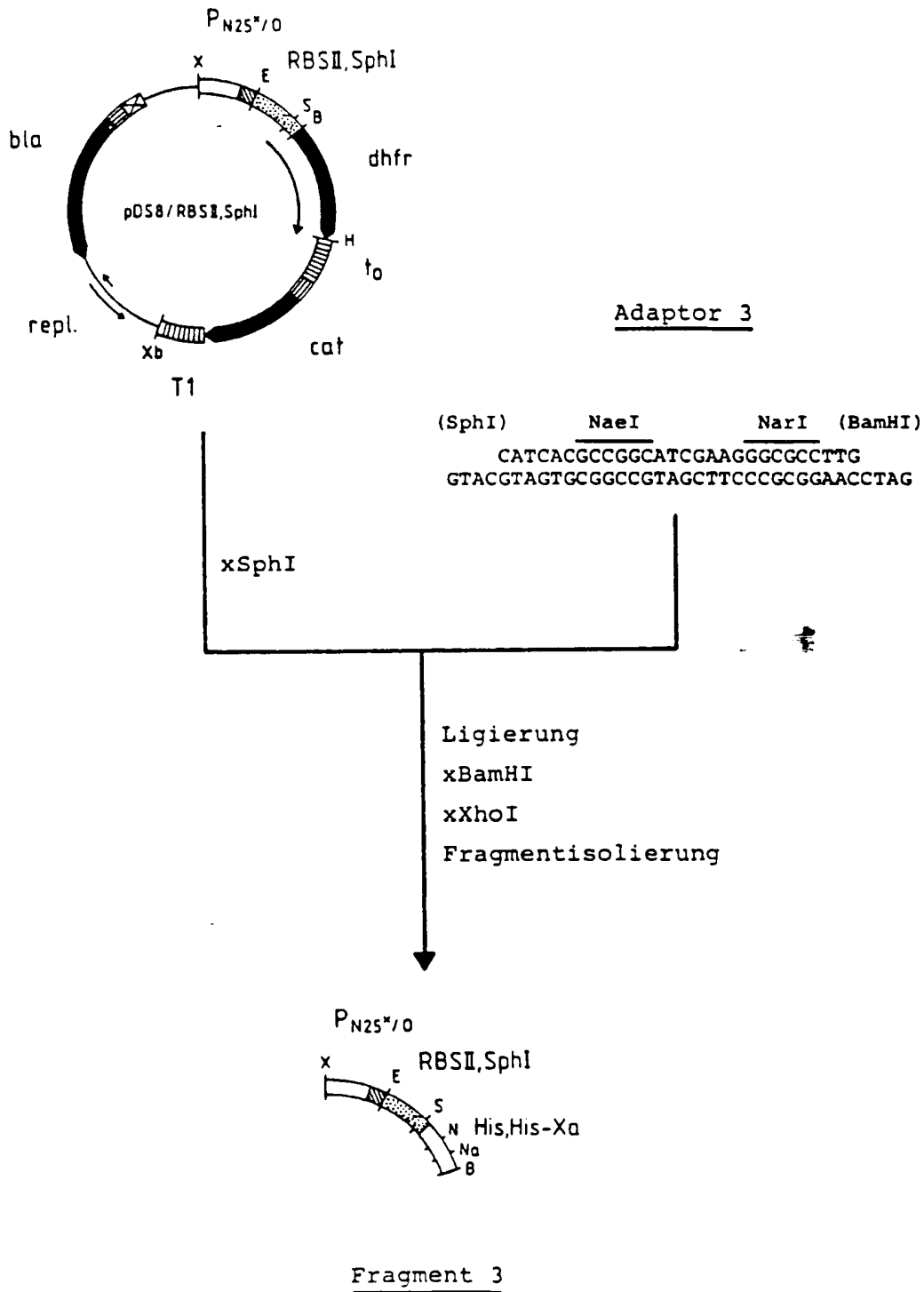


Abbildung 17

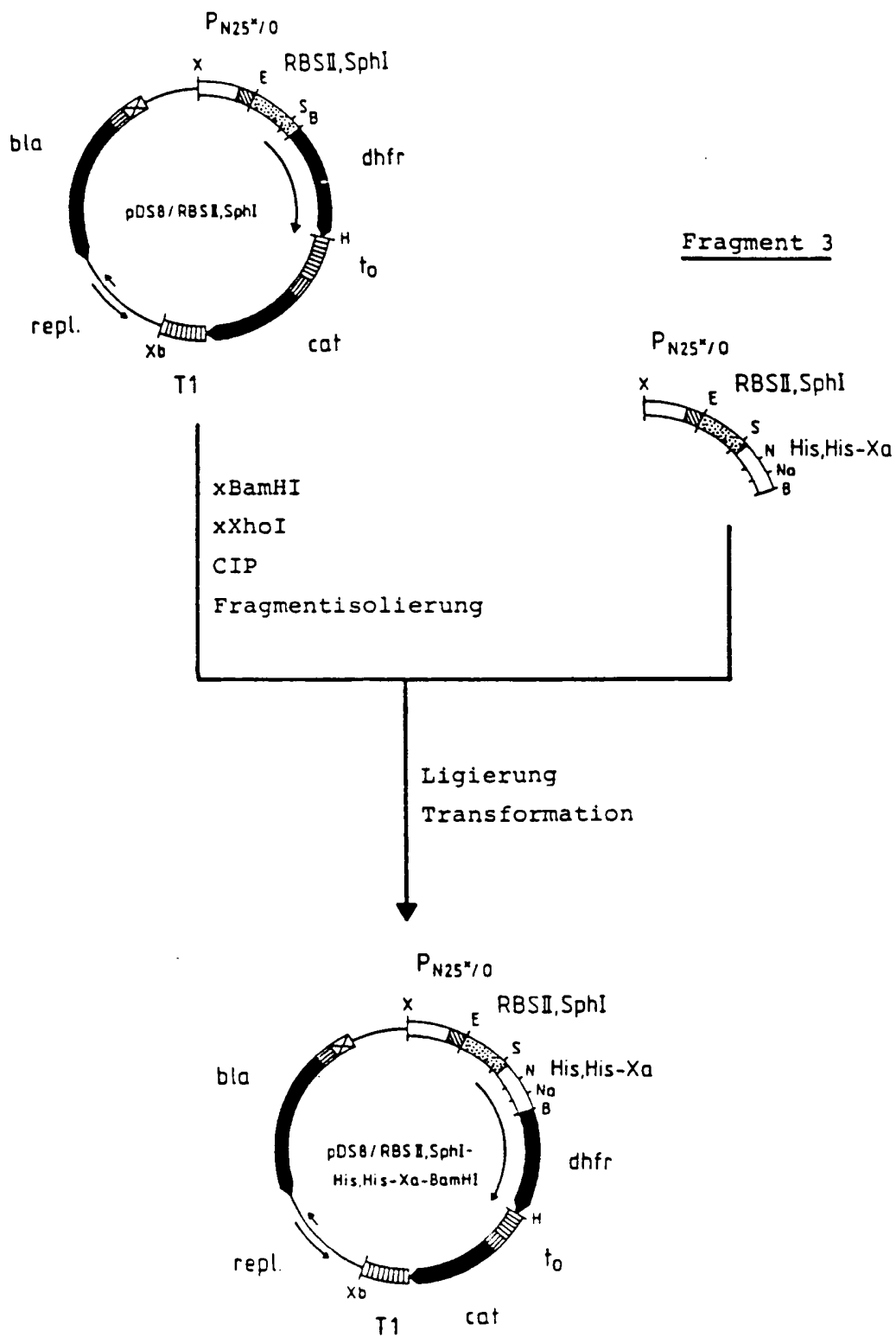


Abbildung 18

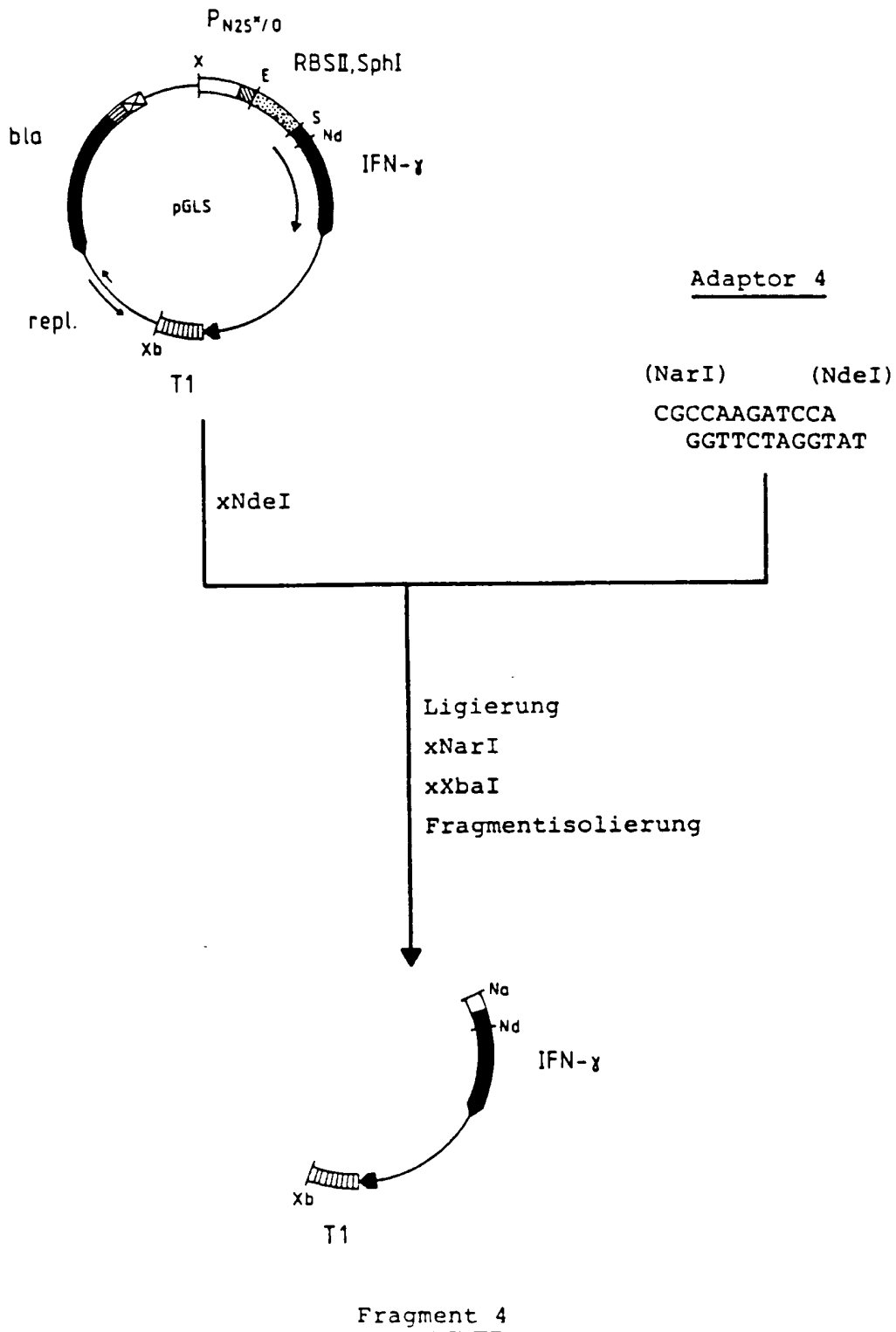


Abbildung 19

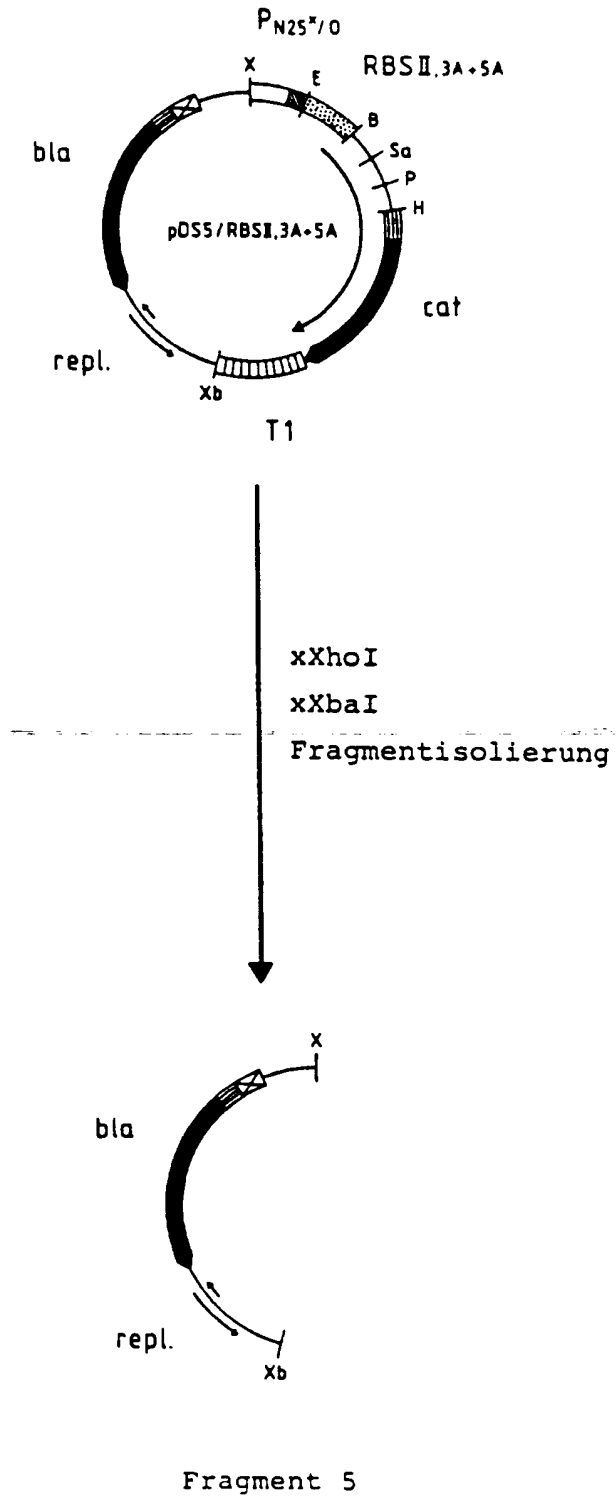


Abbildung 20

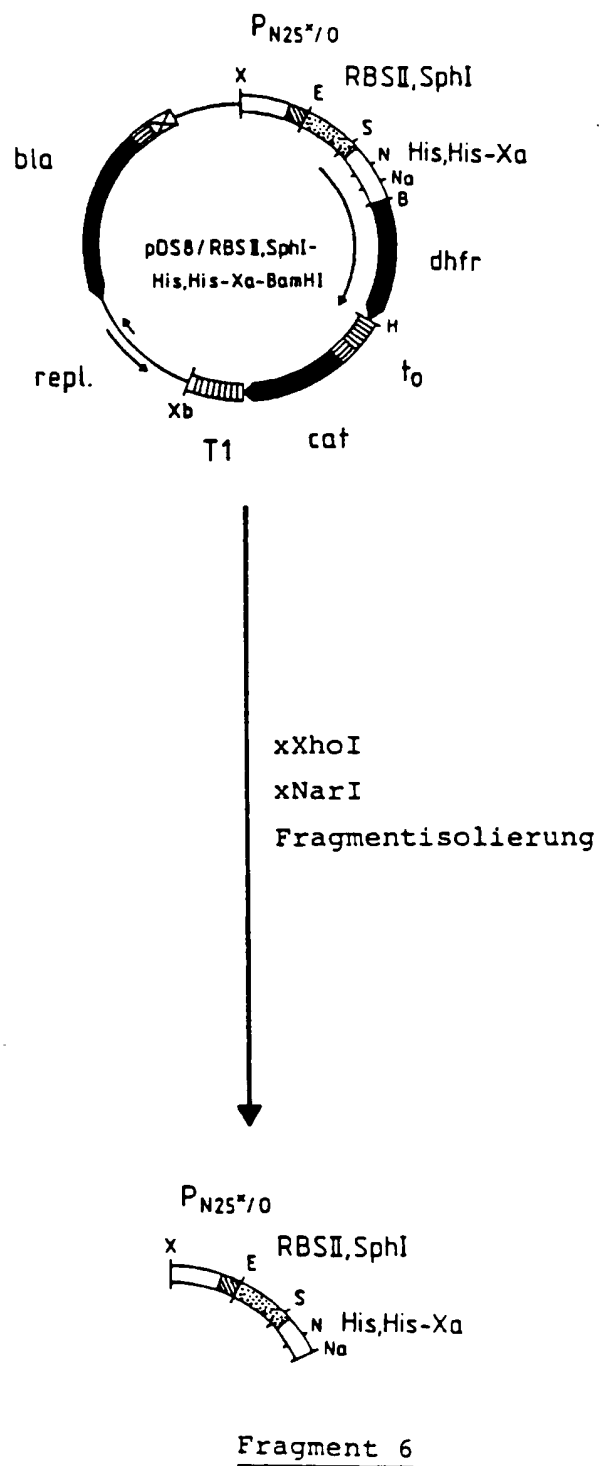


Abbildung 21

Fragment 6

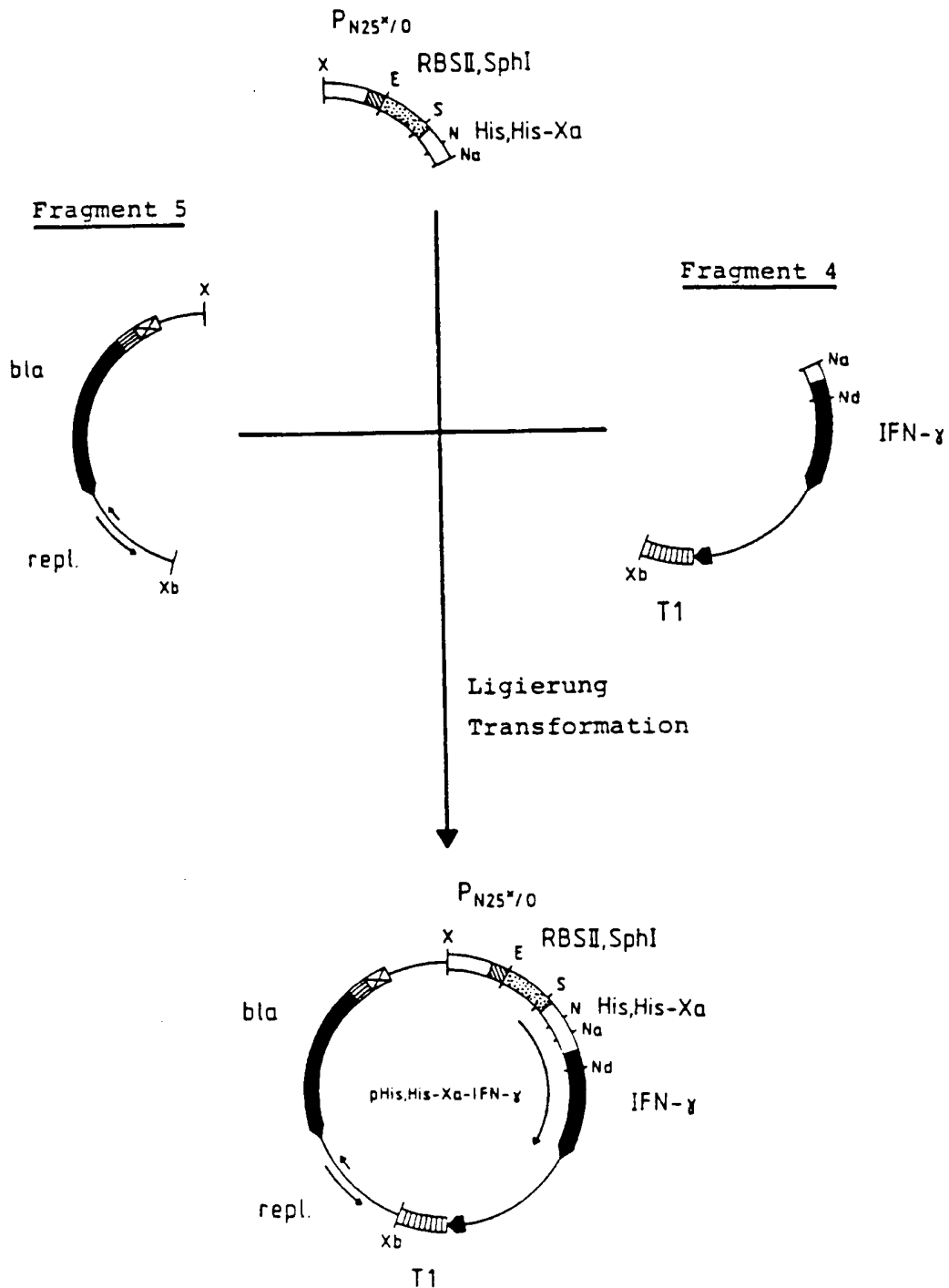
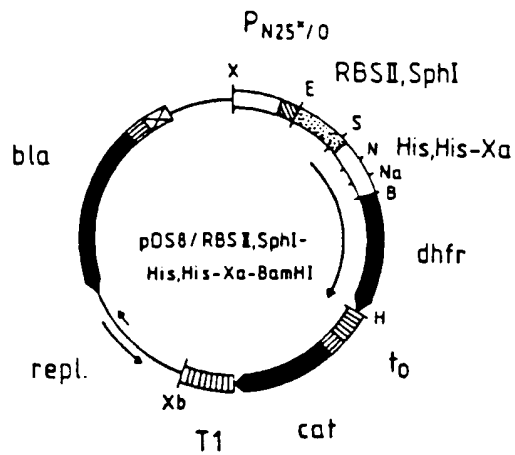
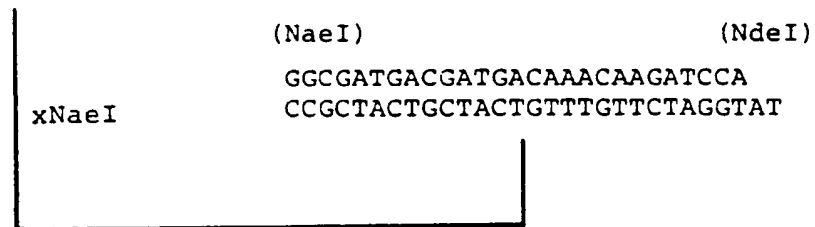


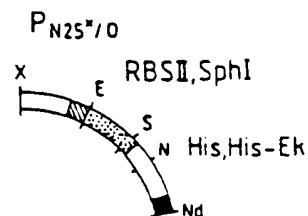
Abbildung 22



Adaptor 5

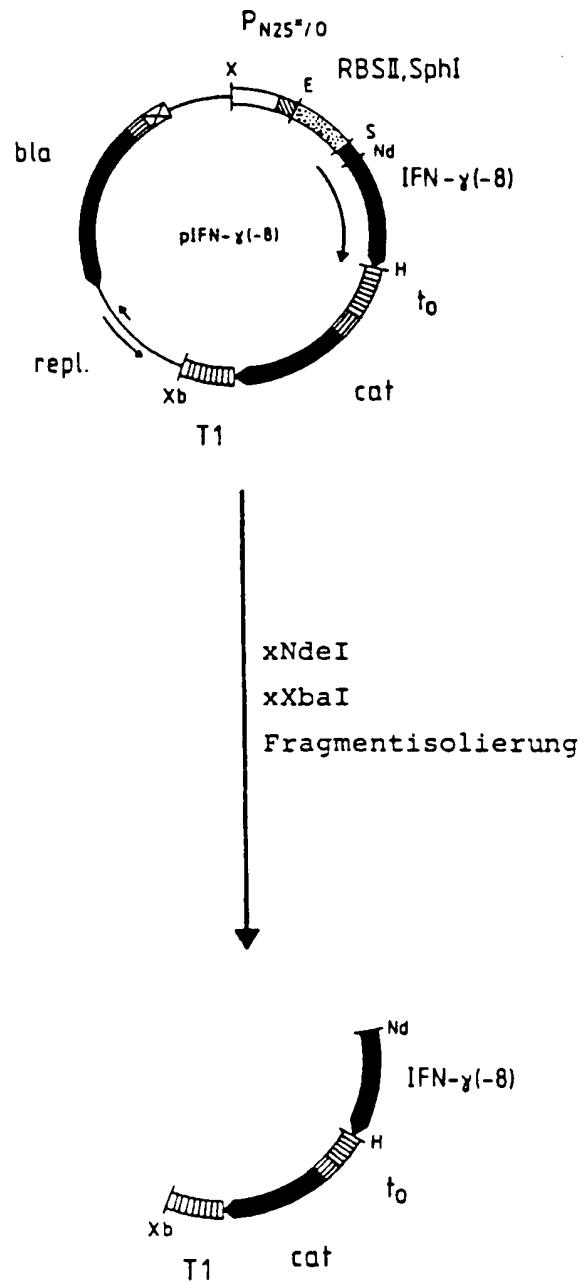


Ligierung
 xXhoI
 xNdeI
 Fragmentisolierung



Fragment 7

Abbildung 23



Fragment 8

Abbildung 24

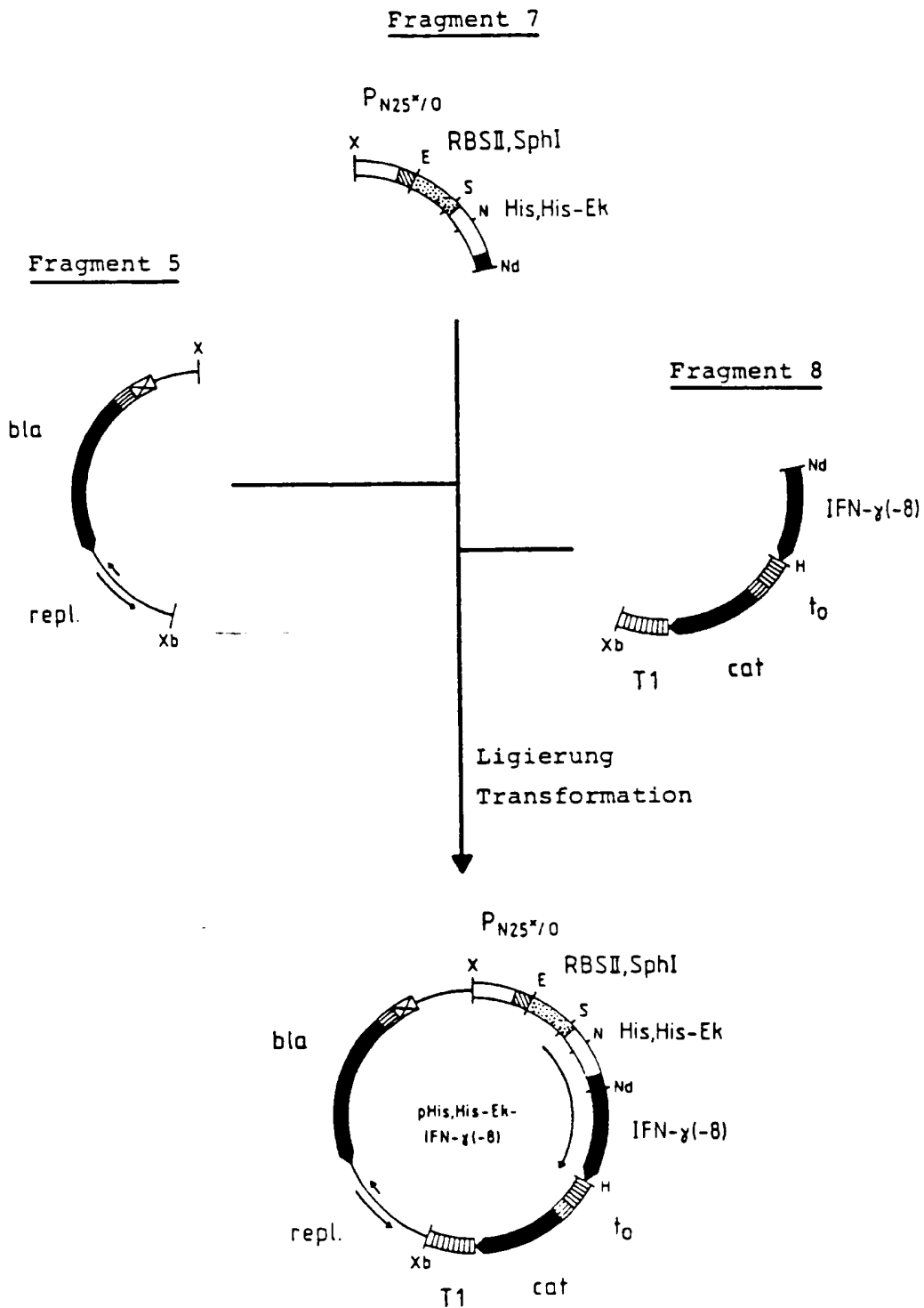


Abbildung 25

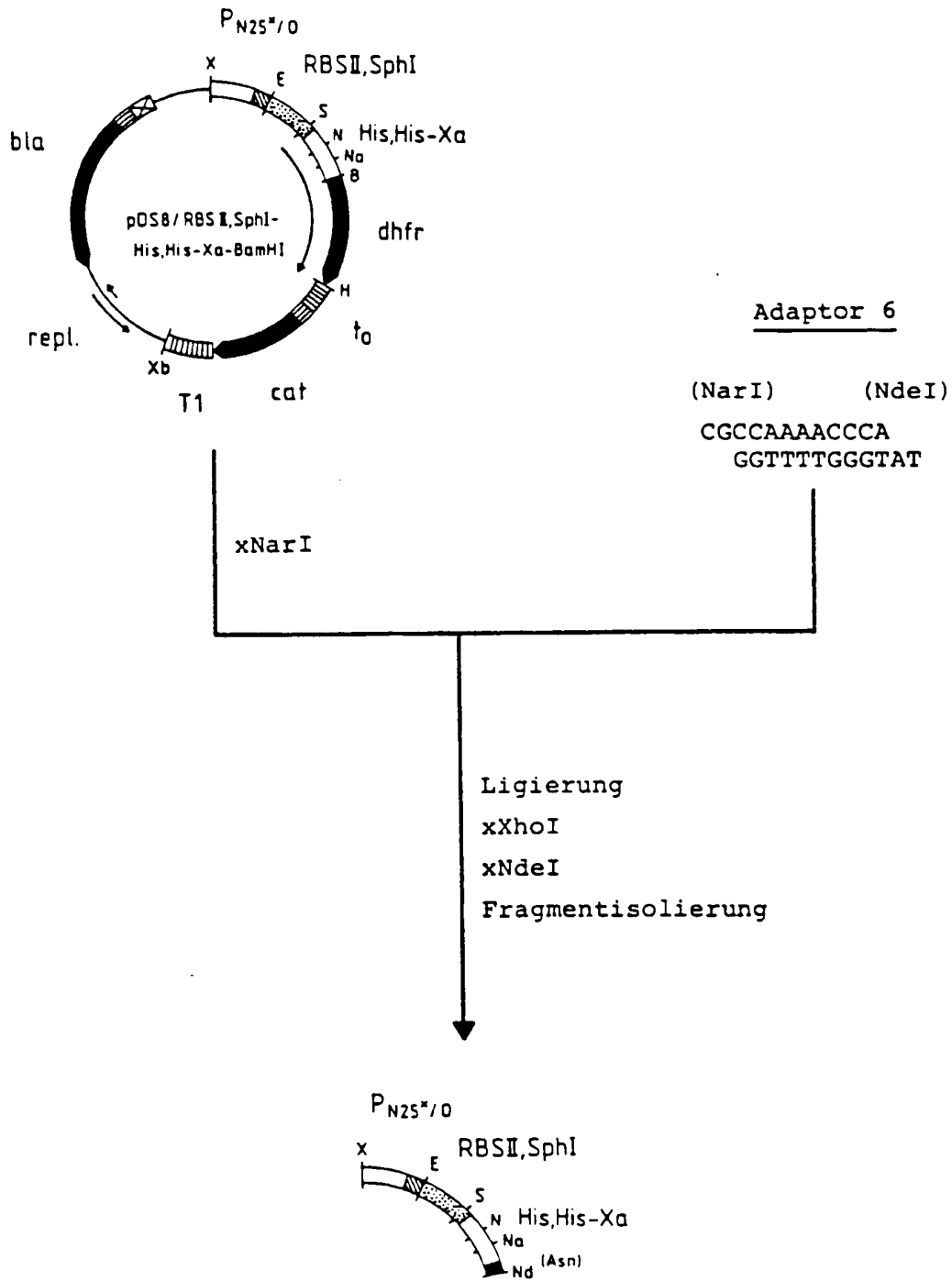


Abbildung 26

Fragment 9

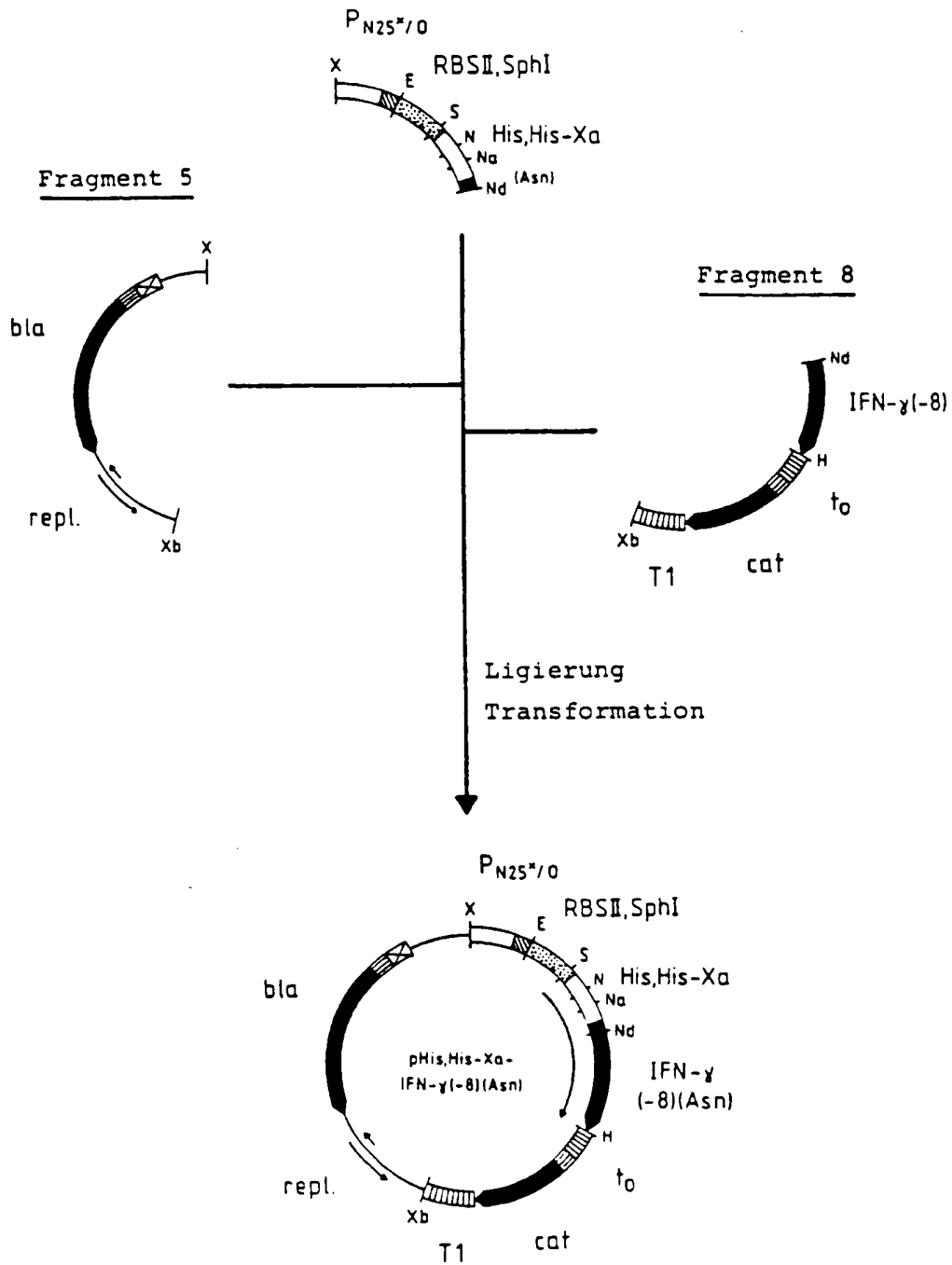


Abbildung 27

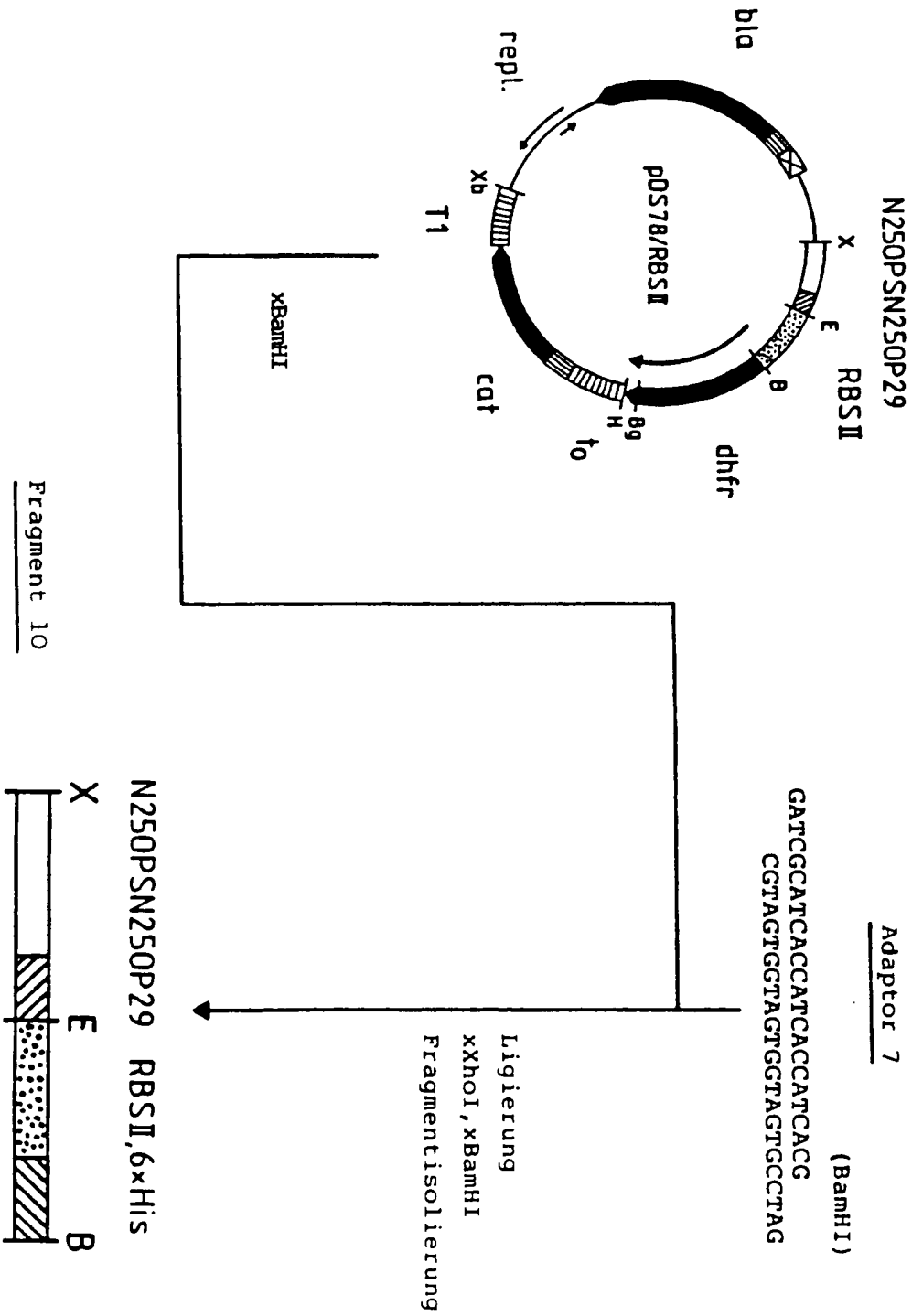


Abbildung 28

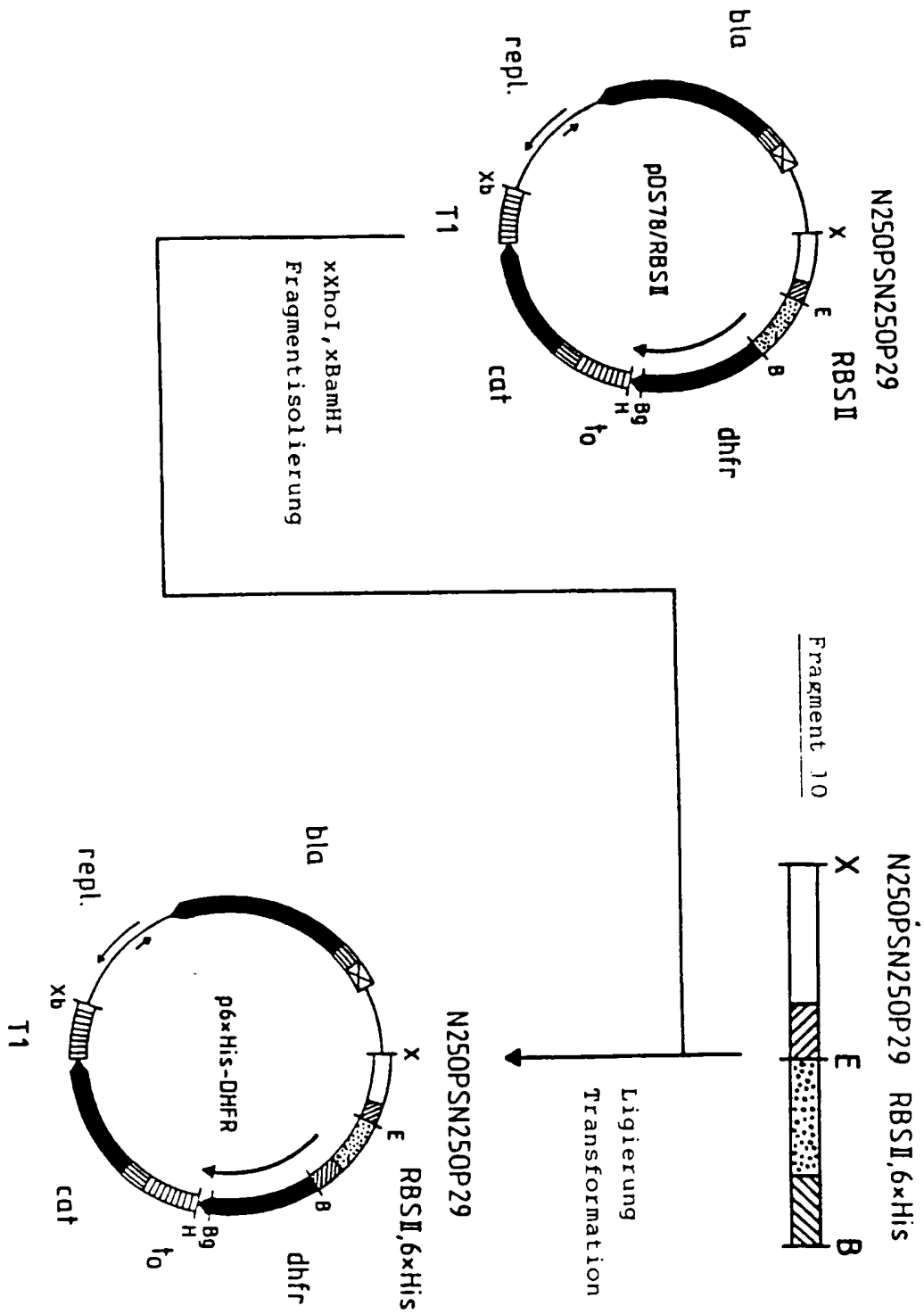


Abbildung 29

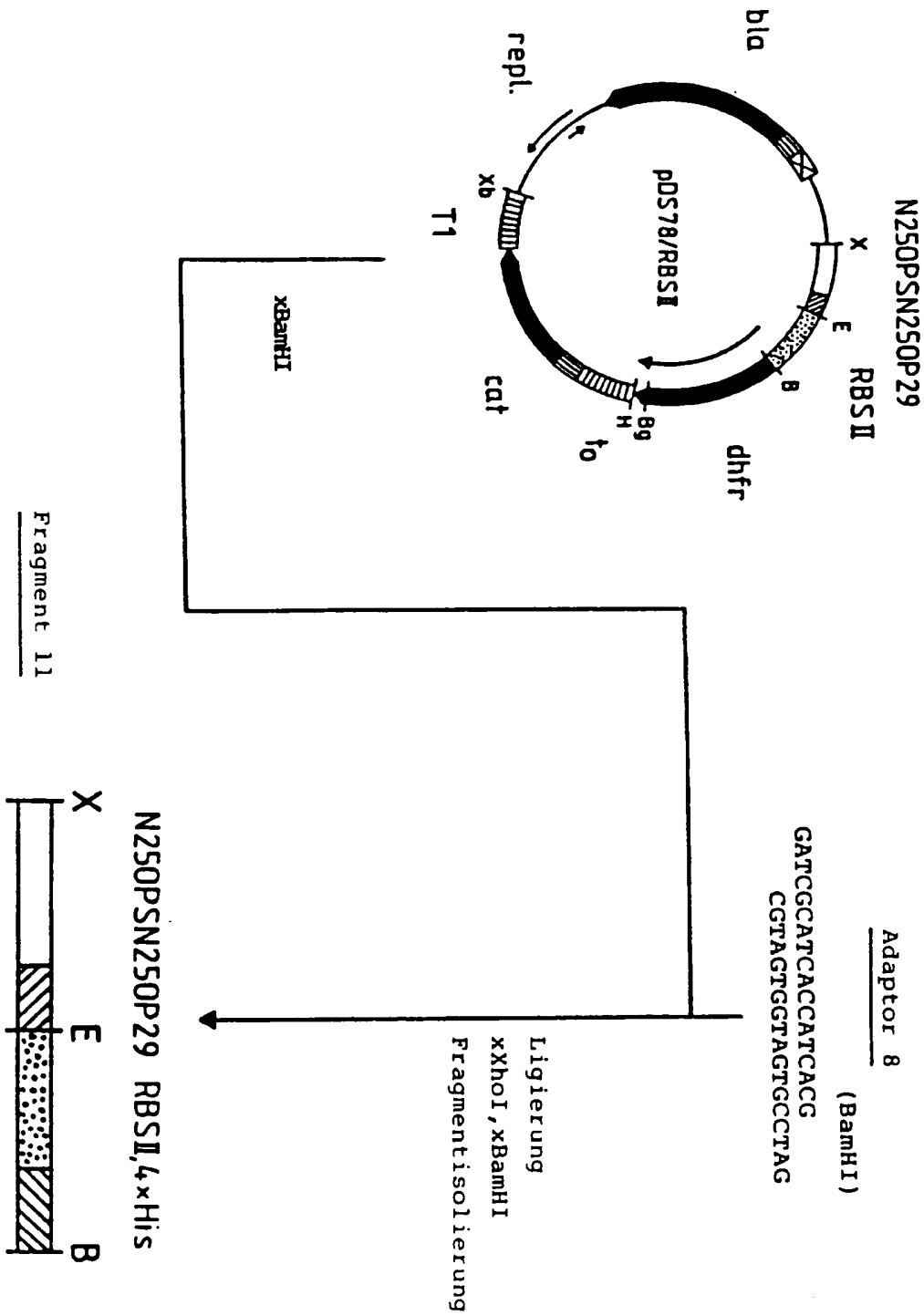


Abbildung 30

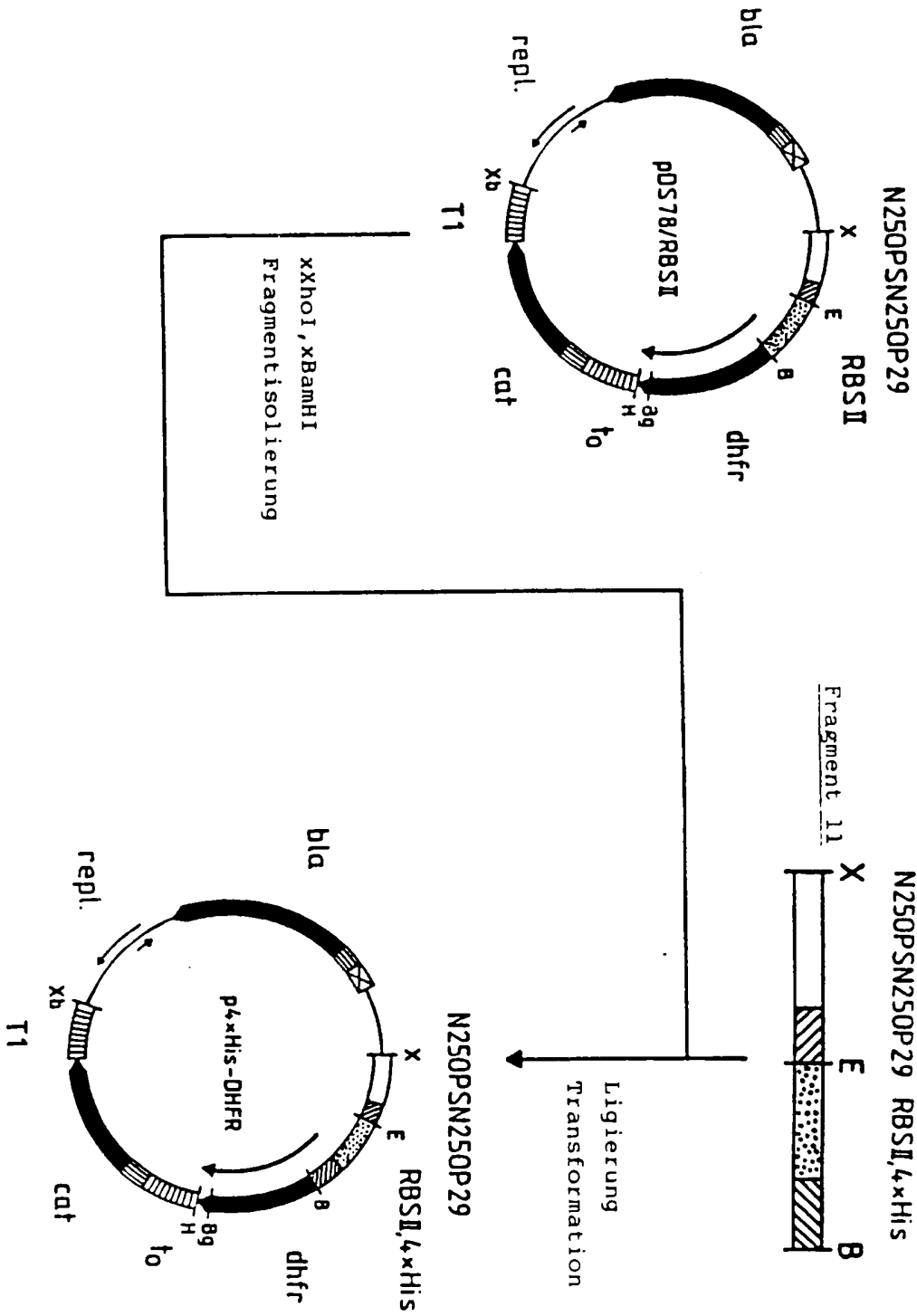
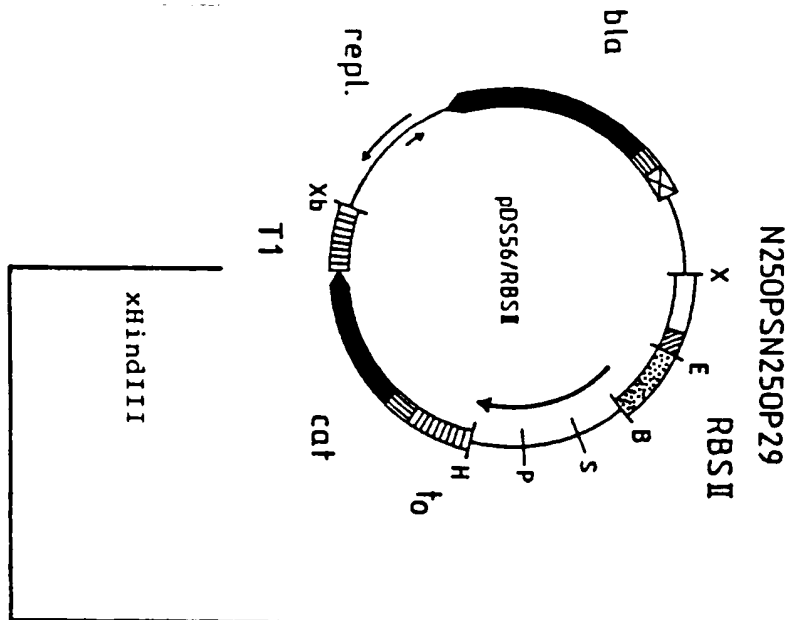


Abbildung 31



Adaptor 9

(BamHI) BglII (HindIII)
 GATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTA
 GTCCTAGAGTAGTGGTAGTGGTAGTTCGA

Ligierung
 xBamHI, xXbaI
 Fragmentisolierung

Fragment 12

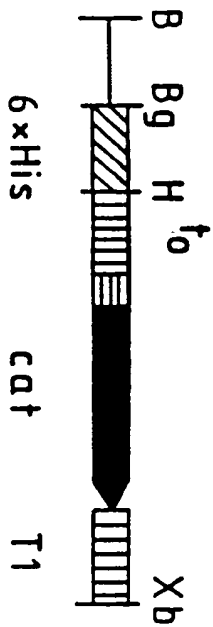


Abbildung 32

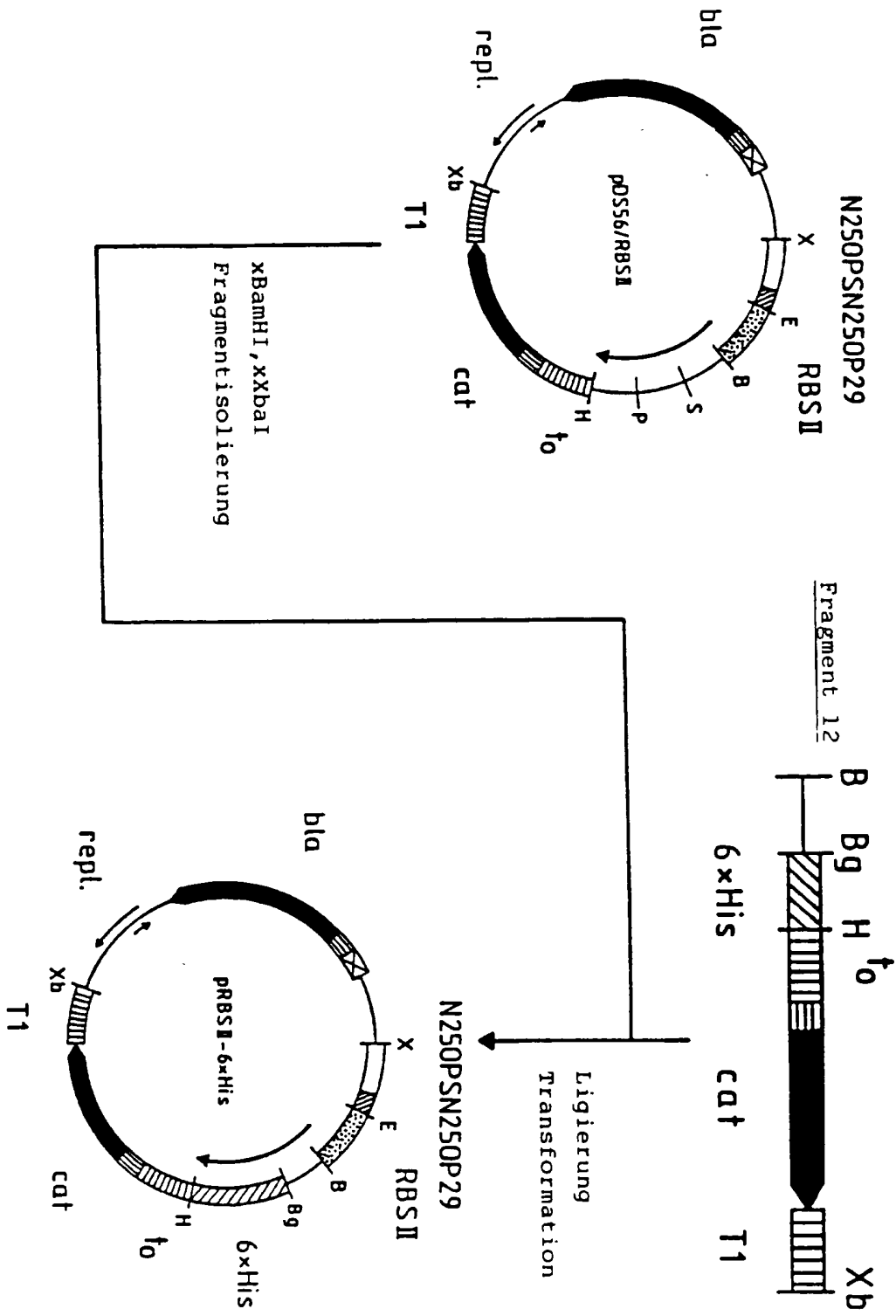


Abbildung 33

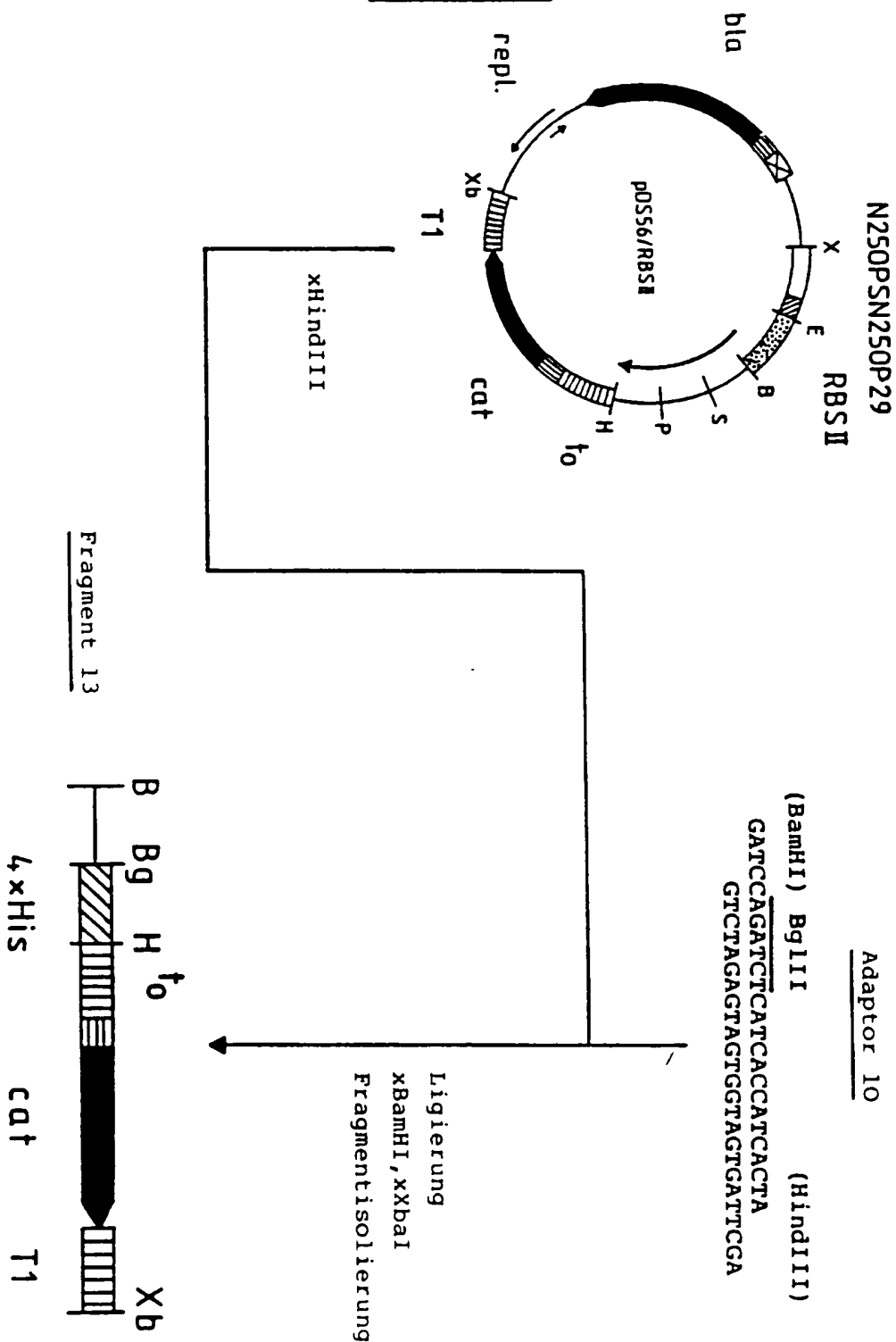


Abbildung 34

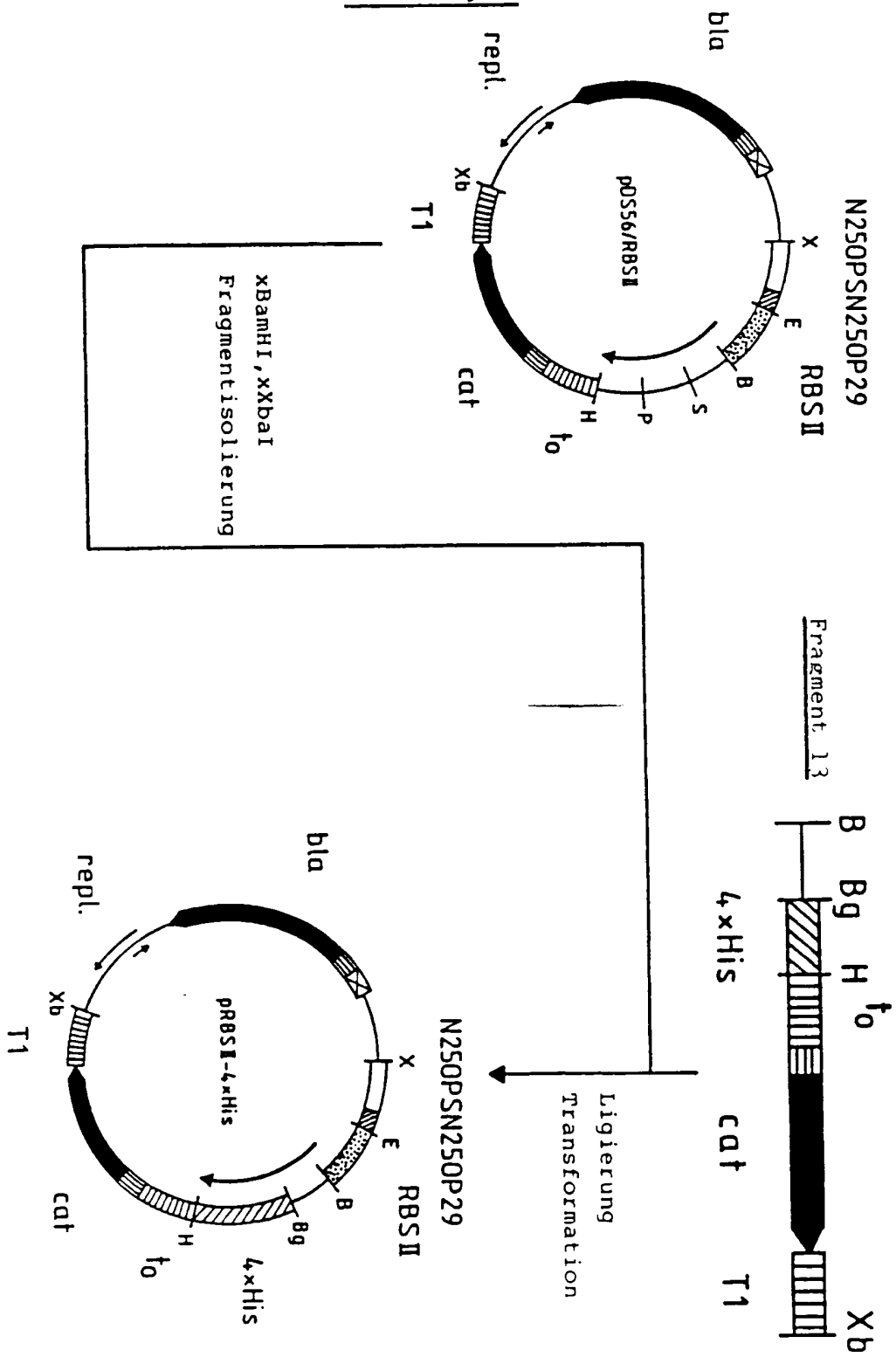
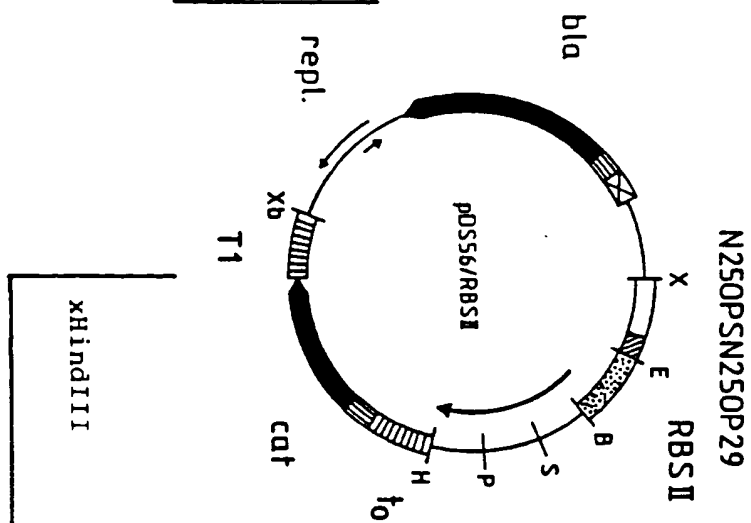


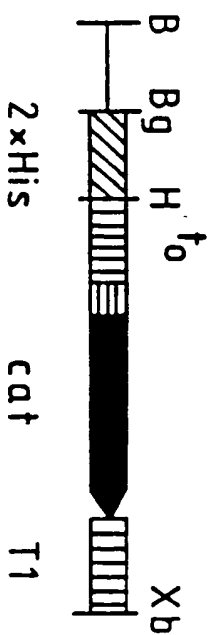
Abbildung 35



Adaptor 11

(BamHI) BglII (HindIII)
 GATCAGATCTCATCACTA
 GTCTAGAGTAGTGATTGCA

Ligierung
 xBamHI, xXbaI
 Fragmentisolierung



Fragment 14

Abbildung 36

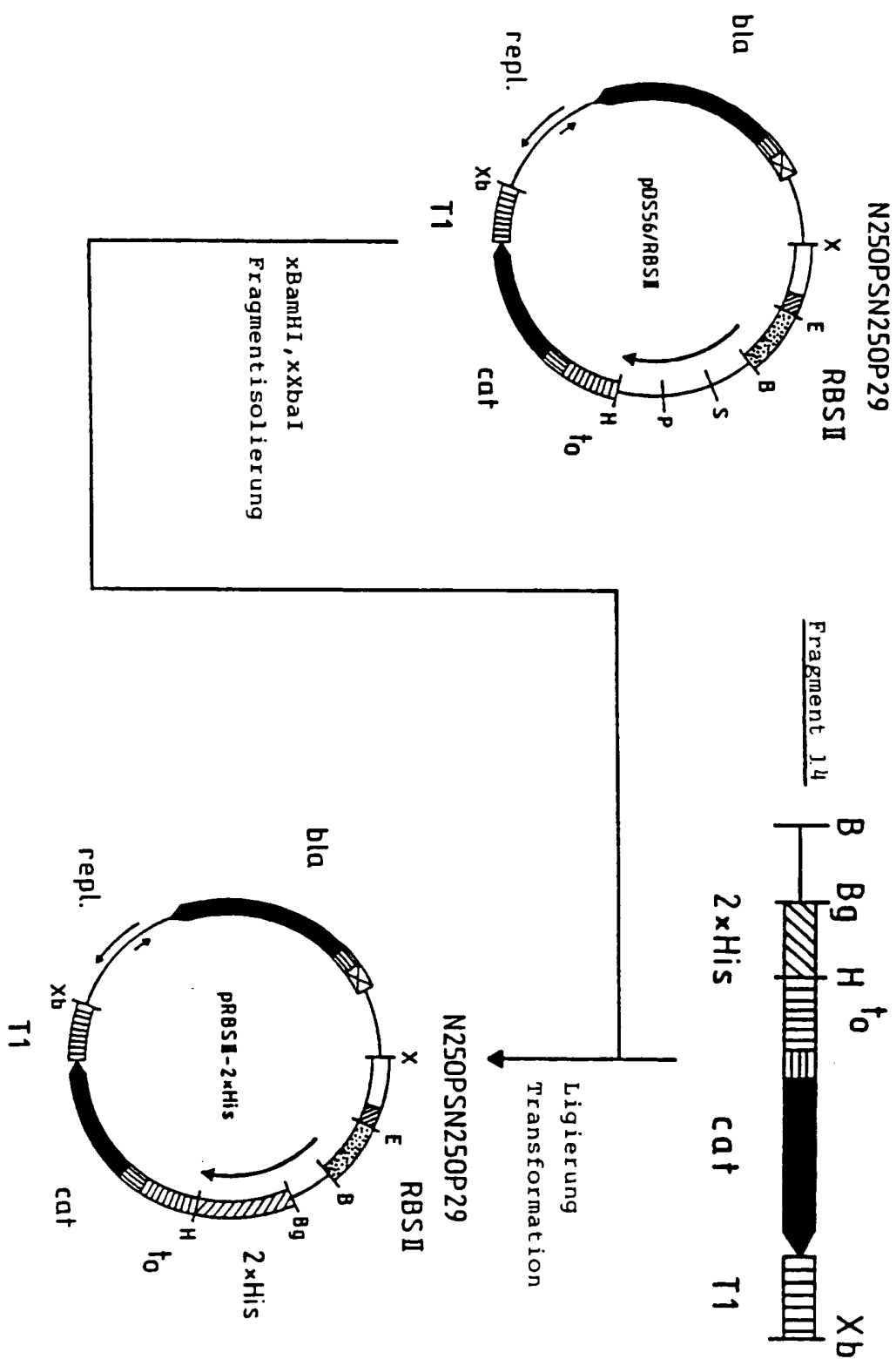


Abbildung 37

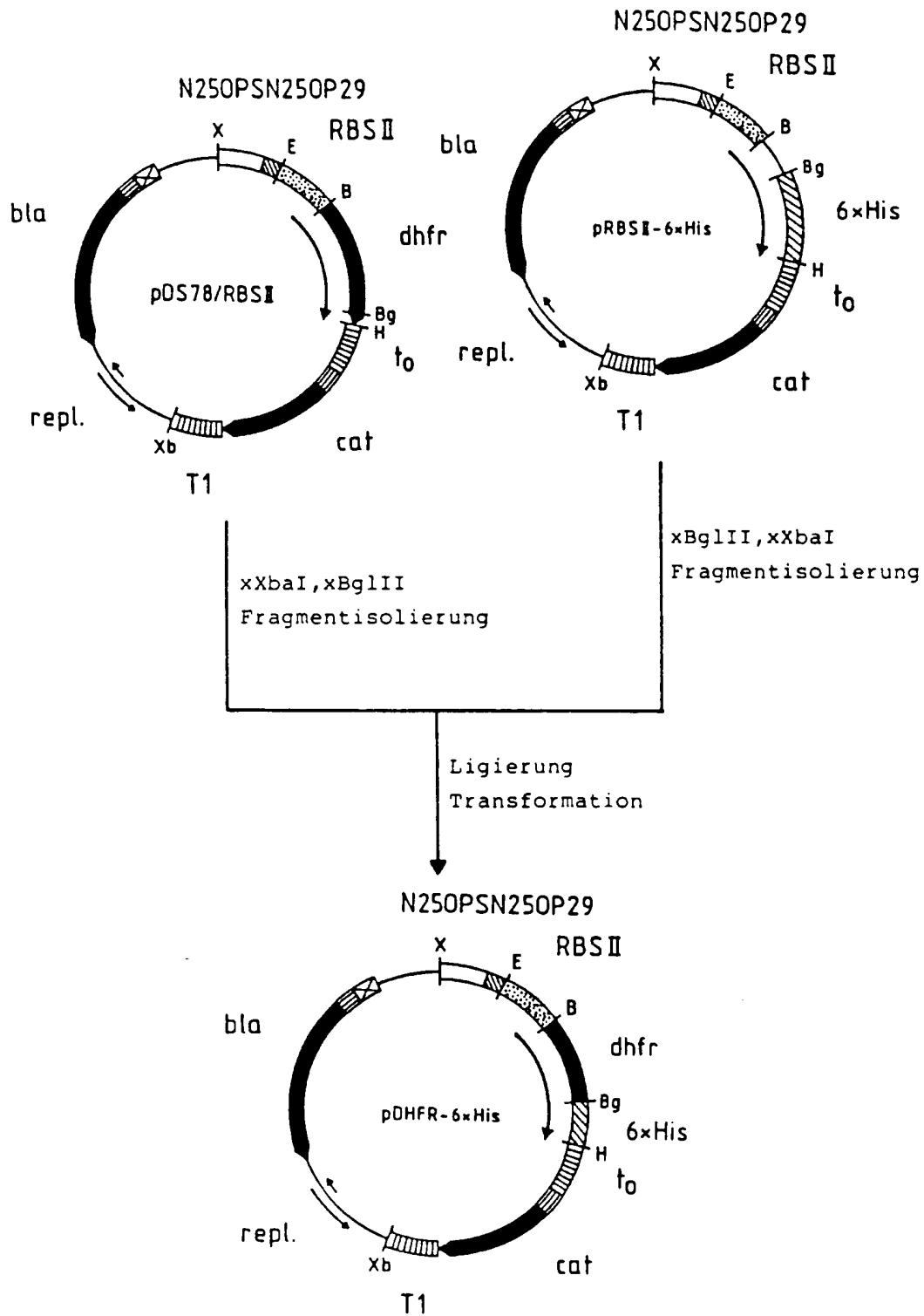


Abbildung 38

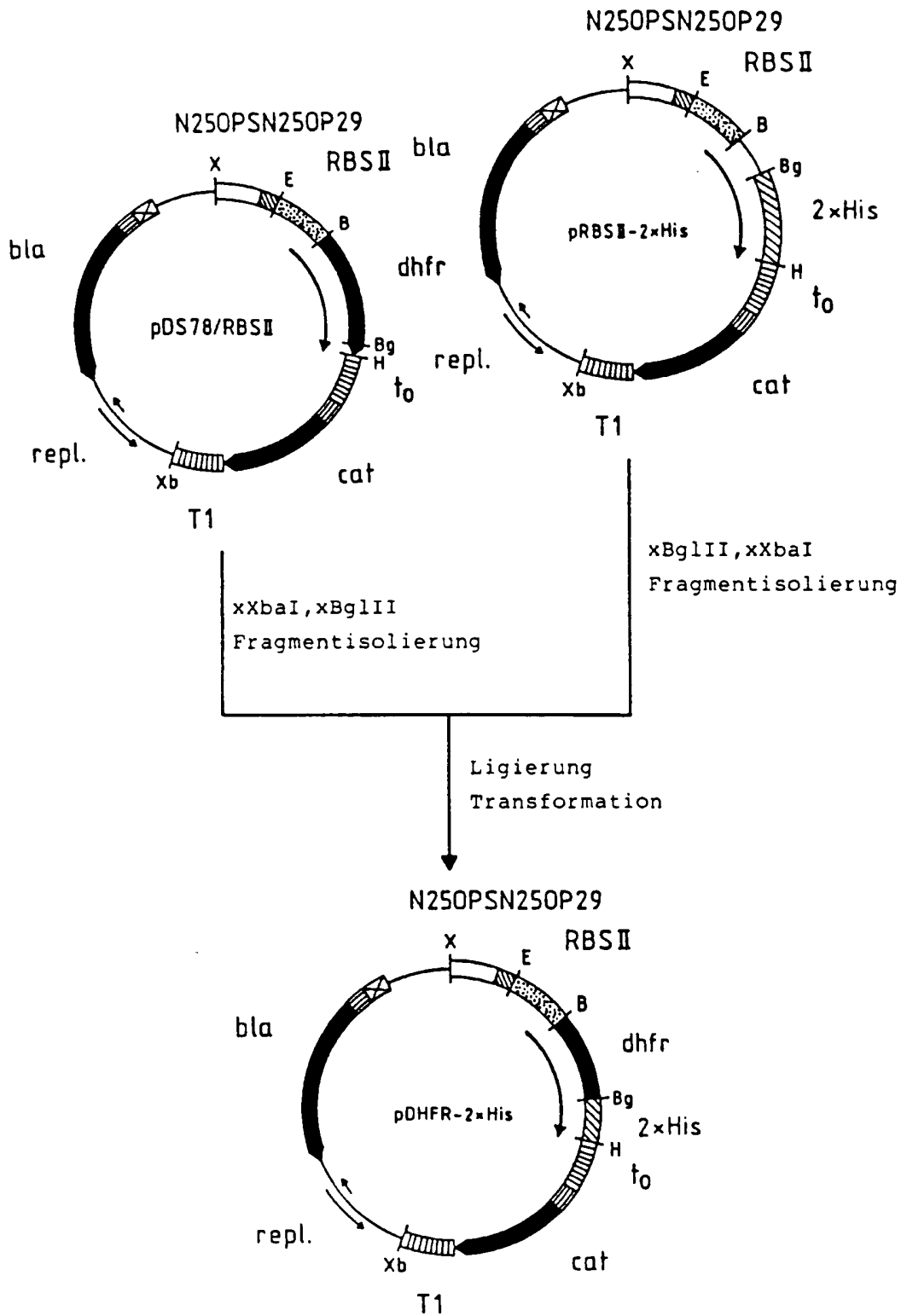


Abbildung 39

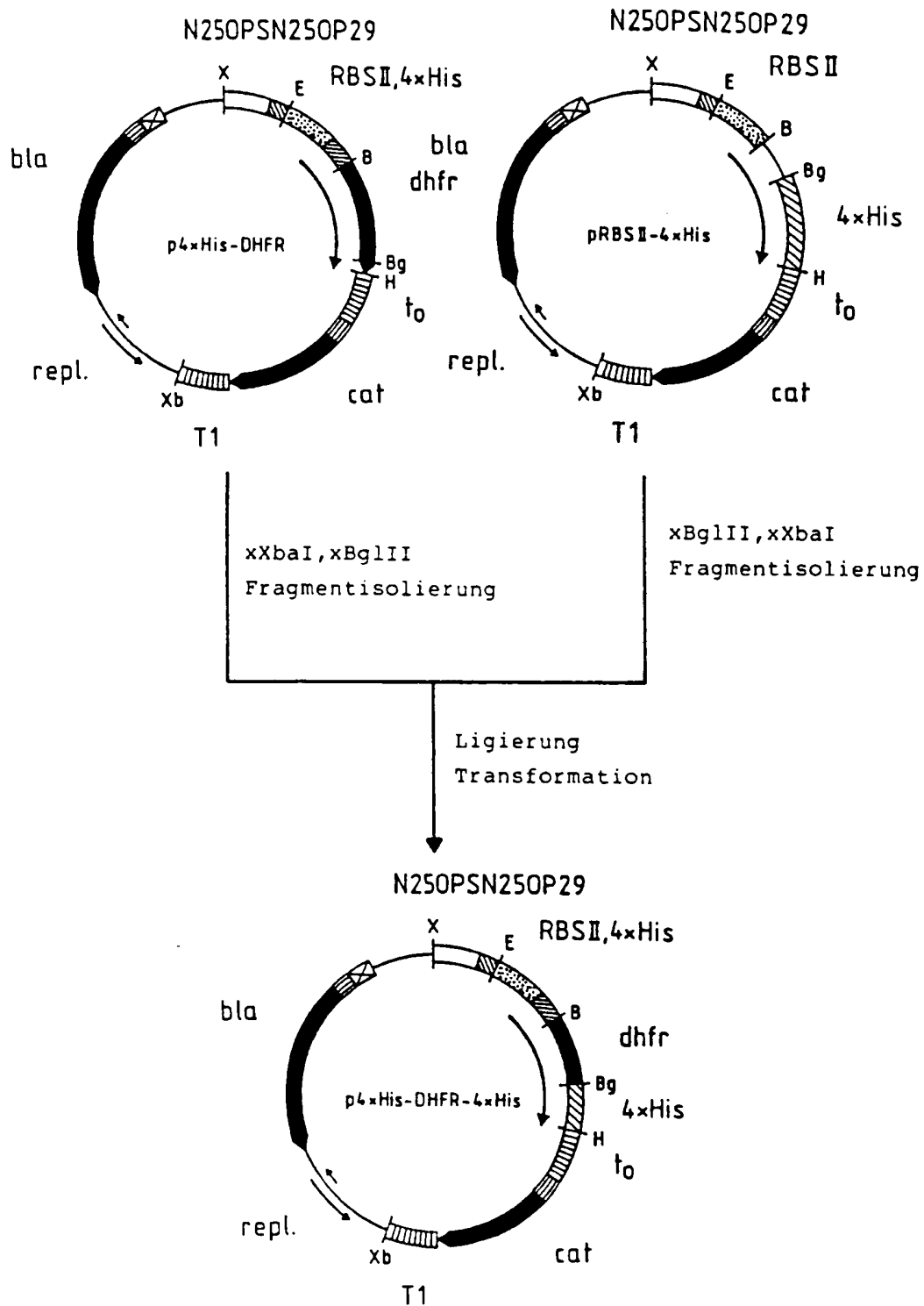


Abbildung 40

			10				20				30				40				
ATG	CAG	GAC	CCA	TAT	GTA	AAA	GAA	GCA	GAA	AAC	CTT	AAG	AAA	TAT					
<u>MET</u>	Gln	Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr					
		50				60				70				80				90	
TTT	AAT	GCA	GGT	CAT	TCA	GAT	GTA	GCG	GAT	AAT	GGA	ACT	CTT	TTC					
Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe					
			100				110				120				130				
TTA	GGC	ATT	TTG	AAG	AAT	TGG	AAA	GAG	GAG	AGT	GAC	AGA	AAA	ATA					
Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg	Lys	Ile					
		140				150				160				170				180	
ATG	CAG	AGC	CAA	ATT	GTC	TCC	TTT	TAC	TTC	AAA	CTT	TTT	AAA	AAC					
<u>MET</u>	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn					
			190				200				210				220				
TTT	AAA	GAT	GAC	CAG	AGC	ATC	CAA	AAG	AGT	GTG	GAG	ACC	ATC	AAG					
Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile	Lys					
		230				240				250				260				270	
GAA	GAC	ATG	AAT	GTC	AAG	TTT	TTC	AAT	AGC	AAC	AAA	AAG	AAA	CGA					
Glu	Asp	<u>MET</u>	Asn	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg					
			280				290				300				310				
GAT	GAC	TTC	GAA	AAG	CTG	ACT	AAT	TAT	TCG	GTA	ACT	GAC	TTG	AAT					
Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn					
		320				330				340				350				360	
GTC	CAA	CGC	AAA	GCA	ATA	CAT	GAA	CTC	ATC	CAA	GTG	ATG	GCT	GAA					
Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His	Glu	Leu	Ile	Gln	Val	<u>MET</u>	Ala	Glu					

Abbildung 40 (Fortsetzung)

			370				380				390				400	
CTG	TCG	CCA	GCA	GCT	AAA	ACA	GGG	AAG	CGA	AAA	AGG	AGT	CAG	ATG		
Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Gln	<u>MET</u>		

	410			420			430	
CTG	TTT	CGA	GGT	CGA	AGA	GCA	TCC	CAG
Leu	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln

Abbildung 41

			10				20				30				40			
ATG	CAT	CAC	GCC	GGC	ATC	GAA	GGG	CGC	CAA	GAT	CCA	TAT	GTA	AAA				
<u>MET</u>	His	His	Ala	Gly	Ile	Glu	Gly	Arg	Gln	Asp	Pro	Tyr	Val	Lys				
			50				60				70				80			90
GAA	GCA	GAA	AAC	CTT	AAG	AAA	TAT	TTT	AAT	GCA	GGT	CAT	TCA	GAT				
Glu	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp				
			100				110				120				130			
GTA	GCG	GAT	AAT	GGA	ACT	CTT	TTC	TTA	GGC	ATT	TTG	AAG	AAT	TGG				
Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp				
			140				150				160				170			180
AAA	GAG	GAG	AGT	GAC	AGA	AAA	ATA	ATG	CAG	AGC	CAA	ATT	GTC	TCC				
Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg	Lys	Ile	<u>MET</u>	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser				
			190				200				210				220			
TTT	TAC	TTC	AAA	CTT	TTT	AAA	AAC	TTT	AAA	GAT	GAC	CAG	AGC	ATC				
Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile				
			230				240				250				260			270
CAA	AAG	AGT	GTG	GAG	ACC	ATC	AAG	GAA	GAC	ATG	AAT	GTC	AAG	TTT				
Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	<u>MET</u>	Asn	Val	Lys	Phe				
			280				290				300				310			
TTC	AAT	AGC	AAC	AAA	AAG	AAA	CGA	GAT	GAC	TTC	GAA	AAG	CTG	ACT				
Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg	Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr				
			320				330				340				350			360
AAT	TAT	TCG	GTA	ACT	GAC	TTG	AAT	GTC	CAA	CGC	AAA	GCA	ATA	CAT				
Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His				

Abbildung 41 (Fortsetzung)

			370				380				390				400	
GAA	CTC	ATC	CAA	GTG	ATG	GCT	GAA	CTG	TCG	CCA	GCA	GCT	AAA	ACA		
Glu	Leu	Ile	Gln	Val	<u>MET</u>	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr		

	410			420			430				440			450
GGG	AAG	CGA	AAA	AGG	AGT	CAG	ATG	CTG	TTT	CGA	GGT	CGA	AGA	GCA
Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Gln	<u>MET</u>	Leu	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Ala

TCC CAG
Ser Gln

Abbildung 42

			10				20				30				40				
ATG	CAT	CAC	GCC	GGC	GAT	GAC	GAT	GAC	AAA	CAA	GAT	CCA	TAT	GTA					
<u>MET</u>	His	His	Ala	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Gln	Asp	Pro	Tyr	Val					
	50			60			70			80			90						
AAA	GAA	GCA	GAA	AAC	CTT	AAG	AAA	TAT	TTT	AAT	GCA	GGT	CAT	TCA					
Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser					
		100			110			120			130								
GAT	GTA	GCG	GAT	AAT	GGA	ACT	CTT	TTC	TTA	GGC	ATT	TTG	AAG	AAT					
Asp	Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn					
	140			150			160			170			180						
TGG	AAA	GAG	GAG	AGT	GAC	AGA	AAA	ATA	ATG	CAG	AGC	CAA	ATT	GTC					
Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg	Lys	Ile	<u>MET</u>	Gln	Ser	Gln	Ile	Val					
		190			200			210			220								
TCC	TTT	TAC	TTC	AAA	CTT	TTT	AAA	AAC	TTT	AAA	GAT	GAC	CAG	AGC					
Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser					
	230			240			250			260			270						
ATC	CAA	AAG	AGT	GTG	GAG	ACC	ATC	AAG	GAA	GAC	ATG	AAT	GTC	AAG					
Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	<u>MET</u>	Asn	Val	Lys					
		280			290			300			310								
TTT	TTC	AAT	AGC	AAC	AAA	AAG	AAA	CGA	GAT	GAC	TTC	GAA	AAG	CTG					
Phe	Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg	Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu					

Abbildung 42 (Fortsetzung)

320		330		340		350		360
ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CAA CGC AAA GCA ATA								
Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile								
	370		380		390		400	
CAT GAA CTC ATC CAA GTG ATG GCT GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA								
His Glu Leu Ile Gln Val <u>MET</u> Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys								
410		420		430				
ACA GGG AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG								
Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln <u>MET</u> Leu								

Abbildung 43

			10				20			30			40		
ATG	CAT	CAC	GCC	GGC	ATC	GAA	GGG	CGC	CAA	AAC	CCA	TAT	GTA	AAA	
<u>MET</u>	His	His	Ala	Gly	Ile	Glu	Gly	Arg	Gln	Asn	Pro	Tyr	Val	Lys	
	50			60			70			80			90		
GAA	GCA	GAA	AAC	CTT	AAG	AAA	TAT	TTT	AAT	GCA	GGT	CAT	TCA	GAT	
Glu	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp	
		100			110			120			130				
GTA	GCG	GAT	AAT	GGA	ACT	CTT	TTC	TTA	GGC	ATT	TTG	AAG	AAT	TGG	
Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	
	140			150			160			170			180		
AAA	GAG	GAG	AGT	GAC	AGA	AAA	ATA	ATG	CAG	AGC	CAA	ATT	GTC	TCC	
Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg	Lys	Ile	<u>MET</u>	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	
		190			200			210			220				
TTT	TAC	TTC	AAA	CTT	TTT	AAA	AAC	TTT	AAA	GAT	GAC	CAG	AGC	ATC	
Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile	
	230			240			250			260			270		
CAA	AAG	AGT	GTG	GAG	ACC	ATC	AAG	GAA	GAC	ATG	AAT	GTC	AAG	TTT	
Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	<u>MET</u>	Asn	Val	Lys	Phe	
		280			290			300			310				
TTC	AAT	AGC	AAC	AAA	AAG	AAA	CGA	GAT	GAC	TTT	GAA	AAG	CTG	ACT	
Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg	Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	

Abbildung 43 (Fortsetzung)

320		330		340		350		360						
AAT	TAT	TCG	GTA	ACT	GAC	TTG	AAT	GTC	CAA	CGC	AAA	GCA	ATA	CAT
Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His
		370		380		390		400						
GAA	CTC	ATC	CAA	GTG	ATG	GCT	GAA	CTG	TCG	CCA	GCA	GCT	AAA	ACA
Glu	Leu	Ile	Gln	Val	<u>MET</u>	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr
410		420		430										
GGG	AAG	CGA	AAA	AGG	AGT	CAG	ATG	CTG						
Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Gln	<u>MET</u>	Leu						